



Etude du cycle cytotoxique des NO-Synthases : production et activation du peroxy-nitrite

Amandine Marechal

► To cite this version:

Amandine Marechal. Etude du cycle cytotoxique des NO-Synthases : production et activation du peroxy-nitrite. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT : . tel-00553493

HAL Id: tel-00553493

<https://theses.hal.science/tel-00553493>

Submitted on 7 Jan 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre :
8888

Université Paris-Sud XI
UFR Scientifique d'Orsay
Ecole Doctorale de Chimie de Paris-Sud

THESE

Présentée en vue de l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS XI

par

Melle Amandine MARECHAL

**ETUDE DU CYCLE CYTOTOXIQUE DES NO-SYNTASES :
PRODUCTION ET ACTIVATION DU PEROXYNITRITE.**

Soutenance du 13 décembre 2007

Composition du jury

Dr Jean-Luc Boucher	<i>rapporteur</i>
Dr Michael Marden	<i>rapporteur</i>
Pr Jean-Pierre Mahy	<i>président</i>
Dr Stéphane Arbault	<i>examineur</i>
Dr Jérôme Santolini	<i>examineur</i>
Dr Alfred Rutherford	<i>examineur</i>

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Messieurs Jean-Pierre Mahy, Michaël Marden, Jean-Luc Boucher et Stéphane Arbault de me faire l'honneur de juger mon travail. Je leur en suis reconnaissante et leur souhaite une agréable lecture.

Ensuite je tiens à remercier chaleureusement Jérôme Santolini, pour m'avoir fait confiance, m'avoir appris à être autonome et avoir développé mon esprit critique et scientifique. Merci de m'avoir offert ce passionnant sujet de thèse. Merci d'avoir voulu pour moi ce que tu pouvais m'apprendre de mieux.

Je tiens également à remercier Tony Mattioli, qui a été pour moi un soutien important. Merci pour tous tes conseils avisés, pour ton humour et ton humeur.

Je tiens à remercier très particulièrement mes deux meilleurs collaborateurs: Véronique Balland et Alain Boussac. Travailler avec vous a été un réel plaisir, vous êtes de ceux qui m'ont donné le goût de ce métier. Merci également à Martin Sjödin, pour nos discussions scientifiques et toutes ces pages remplies d'équations cinétiques.

Ces trois années de thèse ont été pour moi source d'épanouissement permanent. Tout d'abord, parce que j'ai eu la chance de réaliser ces travaux au Commissariat à l'énergie atomique de Saclay (CEA), et qu'en plus de son environnement scientifique stimulant, ça m'a permis de saisir et de créer de belles opportunités. Merci à Pierre Legrain, Bruno Robert, Bill Rutherford et Jérôme (encore!) d'avoir soutenu tous mes projets, je vous en suis très reconnaissante.

Ensuite parce que j'ai été entourée de toutes ces personnes qui me sont chères et que j'aimerais à présent remercier d'avoir partagé ce moment de ma vie.

A mes meilleurs amis, Marjorie, Véronique (toujours la même) et Damien, Marie et Julien (sans oublier le petit Paul), Annamaria et Simon (tous mes vœux de bonheur pour votre mariage à venir), Stéphane et Stefania, Ben et Luc (et Simon), Christian et Lucy, Valérie, Mélanie et François (avec Ostinato). A toutes les soirées passées ensemble, aux litres de bières bus, aux plus belles bouteilles ouvertes, aux repas délicieux, à toutes nos cocktail stories, à nos rires, à nos larmes, à vous...

A eux s'ajoutent mes meilleurs compagnons de bar, Andy et Christian the german (obviously), sans oublier Leandro, Kostas, Pia et Rikard, Francesca, Gino, Gemma, Sylvie, Bérengère, Alban etc...

De l'ex-SBE, où j'ai fait mes premiers pas, je tiens à remercier... tout le monde ! A commencer par le boss, Bill. Merci pour tes coups de blues. Ensuite, et je procéderai par étage, je voudrais remercier plus particulièrement au 3^{ème} Bernard et Gwenaëlle, Hervé, Francis bien sûr, Pierre et Diana; au 2nd Karine, Alain (mais je l'ai déjà dit), et Julie à qui j'adresse une pensée toute particulière; au 1^{er} Winfried, Eliane, et puis Jacques surtout. Mais je ne veux oublier personne alors pour finir, en vrac, merci à: Klauss, Sandra, Naoko, Than, Sun, Adjélé, Eiri, Alistair, Raoul, Anabella, Anja, Fernando... et chez nous merci à Claire et Kinsley (bonne chance pour vos thèses !), à Pierre et à Cécile aussi.

Merci à tous pour les p'tits dèj du vendredi matin, les déjeuners à la cantine, les bavardages en coin de paillasse, les nombreux pots, les coups de mains, les conseils, les innombrables trajets en RER, en bus, et surtout merci pour toutes vos belles histoires.

De l'ex-SBFM, je garderai le meilleur souvenir de Ghada, Maïté, Samuel, François, Marcel, et surtout de la dream team (Andy et Bruno, vous vous reconnaitrez !).

Enfin j'aurais une pensée très spéciale pour les filles du SAFID, les très charmantes Eliane, Christine, Monique (et ses bonbons), Soizic et Karelle. Pas une journée n'est passée sans que vos rires ne viennent l'égayer. Mesdames : vous êtes superbes!

Pour terminer, j'aimerais remercier du fond du cœur ceux à qui je dois d'en être arrivée là et à qui je « dédie » ce manuscrit. Tout d'abord ma famille qui a toujours cru en moi et me soutient dans chacun de mes efforts. Merci de tant d'amour. Ensuite François Volatron, ce professeur envers qui j'ai une si grande estime et que je ne remercierai jamais assez. Et enfin (le meilleur pour la fin) Francesco Bernabei, l'amoremio, auprès de qui ma vie est si belle... à tous nos projets passés et à venir... à nous !

Liste des abréviations

Arg	L-arginine
BS	Bas spin
bsNOS	NO-synthase isolée de <i>Bacillus subtilis</i>
CaM	Calmoduline
Cit	L-citrulline
CO ₂	Dioxyde de carbone
DHR	Dihydrorhodamine
Di-HPA	Dimère de HPA
D. O.	Densité optique
DTPA	Acide diéthylène-triamine-penta-acétique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
eNOS	NO-synthase endothéliale
ENH	Electrode normale à hydrogène
FAD	Flavine adénine dinucléotide
Fe ^{II}	Fer ferreux
Fe ^{III}	Fer ferrique
Fe ^{IV}	Fer ferryll
FMN	Flavine mononucléotide
GCs	Guanylate cyclase soluble
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
H ₂ B	7,8-dihydro-L-bioptérine
H ₄ B	(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-bioptérine
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HEPES	Acide N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-éthanesulfonique
HPA	Acide hydroxyphénylacétique
HPLC	Chromatographie en phase liquide haute pression
HS	Haut spin
iNOS	NO-synthase inductible
KPi	Phosphate inorganique
NADPH	Nicotamide adénine dinucléotide phosphate réduit
nNOS	NO-synthase neuronale
NO	Monoxyde d'azote
·NO ₂	Dioxyde d'azote
NOHA	N ^ω -hydroxy-L-arginine
NOS	NO-synthase
NOSoxy	Domaine oxygénase de la NO-synthase
NOSréd	Domaine réductase de la NO-synthase
NPC	Anion nitrosoperoxycarbonate (ONOO ⁻ CO ₂ ⁻)
NR	Nitrate réductase
O ₂	Dioxygène
PN	Peroxynitrite (ONOO ⁻)
PNH	Acide peroxynitreux (ONOOH)
RNS	Forme réactive de l'azote (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
RPE	Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SOD	Superoxyde dismutase
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane

Résumé.

L'activité des NO-synthases (NOS), unique source de monoxyde d'azote (NO) chez les mammifères, s'inscrit dans des processus de signalisation (régulation de la pression artérielle, communication neuronale) et de cytotoxicité (réponse immunitaire non spécifique). Pour rendre compte de cette dualité physiologique, une partition de leur cycle catalytique a été proposée : une voie produirait du NO (signalisation), et une autre conduirait à la formation de peroxynitrite (ONOOH, PN), molécule hautement oxydante aujourd'hui associée à de nombreuses pathologies. Cependant le PN doit être activé *in vivo* pour exercer sa toxicité, réaction qui peut être catalysée par des porphyrines à fer et donc potentiellement par les NOSs. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était d'étudier le devenir du PN synthétisé par les NOSs et d'analyser les paramètres favorisant sa production afin d'expliquer le rôle cytotoxique de l'isoforme inductible et la spécificité physiologique de chaque isoforme.

Tout d'abord, nous avons étudié l'interaction des NOSs avec PN. Nous avons mis en évidence par une analyse cinétique que quelles soient les conditions expérimentales, le PN synthétisé au site actif de l'enzyme n'était pas libéré mais pris en charge par l'hème pour former d'autres oxydes d'azote. Nous avons proposé un mécanisme en plusieurs étapes pour cette réaction, qui mène à l'isomérisation ou à l'activation du PN suivant que le pH est alcalin ou acide. Dans le cas d'une activation du PN, nous avons observé un intermédiaire pour NOS avec un maximum d'absorption autour de 443 nm qui pourrait correspondre à un complexe oxoferryl, $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, et qui serait formé par rupture homolytique de la liaison O-O du complexe NOS-PN [$\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OONO}$] avec libération concomitante d'un radical $\cdot\text{NO}_2$.

Des études comparatives de réactivité du système {NOS + PN} pour les différentes isoformes ont montré que la paire $\{\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}\cdots\text{NO}_2\}$ conduit soit à l'augmentation des processus d'oxydation à un électron et de nitration de composés extérieurs, soit à la détoxication partielle ou totale du PN. La balance entre ces deux voies (toxicité *versus* détoxication) semble dépendre de la capacité des différentes isoformes à libérer ou à piéger les radicaux $\cdot\text{NO}_2$. Ainsi la diversité de réaction entre NOS et PN (génération ou extinction d'un stress oxydant) pourrait rendre compte de la spécificité physiologique des différentes isoformes.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à caractériser les paramètres physico-chimiques qui peuvent contrôler la production de PN par les NOSs ou l'oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$. Dans un premier temps nous avons développé une nouvelle méthodologie de spectroélectrochimie, qui devrait permettre la mesure fiable du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$. Nous avons mis en évidence des effets distincts du substrat L-arginine et du co-facteur H_4B des NOSs sur la stabilisation de la structure en dimère de la protéine. Nous avons également démontré que l'utilisation de l'analogue H_2B du co-facteur naturel ne peut être utilisé en tant que mime pour des expériences de réactivité puisqu'il n'assure pas cette structuration.

Dans un deuxième temps nous avons étudié les propriétés structurales et électroniques des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ par spectroscopie RPE classique et à impulsions. Nous avons mis en évidence l'existence de trois géométries pour les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$, et avons pu établir une relation d'équilibre thermique entre deux d'entre elles, intrinsèquement contrôlée par l'environnement de l'hème (présence et nature du substrat, type d'isoforme). Ces résultats indiquent que les études structure/fonction des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ ne doivent pas être menées à basse température pour représenter la réalité physiologique des NOSs.

En conclusion, ces travaux représentent la première étude de l'interaction entre le PN et les NOSs et mettent en évidence leur capacité à générer, amplifier ou éteindre un stress oxydant cellulaire. Ils ouvrent des perspectives nouvelles et originales pour la compréhension des paramètres induisant ce stress *in vivo*, ou contrôlant la spécificité biologique des différentes isoformes.

Abstract.

NO-synthases, sole sources of nitric oxide (NO) in mammals, are involved in numerous processes of signalling (arterial pressure regulation, neuronal communication) but also of cytotoxicity (non specific immune response). This physiological duality, correlated to NOS isoforms, could be explained by a production of either NO (for signalling), either peroxynitrite (PN). Indeed, PN is a highly oxidizing molecule associated to several pathologies. Nevertheless, *in vivo*, PN must be activated to exert its toxicity. The aim of this thesis was to investigate PN activation by NOSs and the parameters that favour its production by NOSs. We showed that the interaction between NOSs and PN leads to PN isomerization or activation depending on pH value. PN is activated by a homolytic cleavage that induces the concomitant formation of an oxoferryl intermediate and a nitrogen dioxide radical (NO₂). Depending on the isoform, this oxoferryl/NO₂ pair can either recombine to nitrate (detoxification) either oxidize and/or nitrate external compounds (toxicity). This difference of interaction between PN and each NOS could contribute to the biological specificity of the isoforms. Finally, we started the characterization of the physico-chemical parameters that could control PN production by NOSs. In particular, we were interested in the Fe(II)-NO complex oxidation potential. We showed that this complex was in thermal equilibrium between three conformations, which sets a new and original basis for the structure-function analysis of this complex and the study of PN production by the different NOSs.

Sommaire

Chapitre I. Introduction générale.....	12
1. NO : entre signalisation et cytotoxicité.....	13
1.1. Rôles physiologiques du monoxyde d'azote : NO <i>in vivo</i>	13
1.1.1. dans le système cardiovasculaire.....	13
1.1.2. au niveau des systèmes nerveux central et périphérique.....	14
1.1.3. dans le système immunitaire.....	14
1.2. NO et les formes réactives de l'azote (RNSs).....	15
2. Les NO-synthases : unique source de NO chez les mammifères.....	17
2.1. Généralités :.....	17
2.1.1. Les monomères de NOS.....	17
2.1.2. Les dimères de NOS.....	18
2.2. Les différentes isoformes de NO-synthase :.....	19
2.2.1. Les trois NOSs principales de mammifères.....	19
2.2.2. Les NOSs de bactéries.....	19
2.3. Activités des NO-synthases :.....	20
2.3.1. La biosynthèse de NO :.....	20
2.3.1.1. Première étape du cycle catalytique : oxydation de Arg.....	20
2.3.1.2. Deuxième étape du cycle catalytique : oxydation de NOHA....	21
2.3.2. Régulation de l'activité NO synthase.....	22
2.3.3. Les activités NADPH-oxydase et oxydase.....	23
3. Partition du cycle catalytique : une piste pour expliquer la dualité physiologique des différentes NO-synthases.....	23
4. Objectifs de la thèse.....	24
 Chapitre II. Partie expérimentale.....	 26
1. Obtention, caractérisation spectroscopique et analyses du matériel protéique :.....	27
1.1. Surexpression et purification de iNOSoxy.....	27
1.2. Analyse des protéines :.....	28
1.2.1. Migration par électrophorèse des NOSs : SDS-PAGE.....	28
1.2.2. Mesure d'activité des NOSs : le test de Griess.....	29
1.3. Caractérisation spectroscopique des différents complexes de NOS :.....	30
1.3.1. Présentation des espèces Fe ^{III} de NOS.....	30
1.3.2. Test P450 et détermination de la concentration en NOSoxy.....	31
1.4. Préparation des échantillons Fe ^{II} -NO de NOS :.....	32
1.4.1. Préparation d'une solution anaérobie de dithionite et test cytochrome c..	32
1.4.2. Préparation d'une solution saturée en NO et test à l'hémoglobine.....	32
1.4.3. Formation des complexes Fe ^{II} -NO de NOS.....	33
2. Expériences de cinétiques rapides entre le peroxynitrite et les NOSs :.....	34
2.1. Description du dispositif de mélange rapide.....	34
2.2. Cinétique de décomposition du peroxynitrite.....	35
2.3. Analyse des transitions spectrales sur la protéine.....	36

3. Etude de la réactivité du peroxynitrite activé par les NOSs et conséquence pour l'enzyme :	37
3.1. Réactivité du peroxynitrite activé par les NOSs :	37
3.1.1. Réaction d'oxydation à deux électrons	37
3.1.2. Réaction d'oxydation à un électron	38
3.1.3. Réaction de nitration	39
3.1.4. Mesure de la teneur en nitrites et nitrates :	40
3.1.4.1. Principe	40
3.1.4.2. Test de la nitrate réductase	41
3.2. Etude des modifications intervenues sur NOS après activation du peroxynitrite :	42
3.2.1. Détection de nitro-tyrosine par immuno-précipitation	42
3.2.2. Identification des résidus modifiés :	43
3.2.2.1. Digestion protéique à la trypsine	43
3.2.2.2. Chromatographie HPLC de fragments protéiques	43
3.2.2.3. Spectrométrie de masse	44
4. Mesures biophysiques :	45
4.1. Spectroscopie Raman de résonance	45
4.2. Spectroscopie RPE classique et à impulsions	47
4.3. Spectroélectrochimie :	48
4.3.1. Mesure des potentiels redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy	48
4.3.2. Exploitation des résultats	50

Chapitre III. Etude de la réaction des NO-synthases avec le peroxynitrite : Fe^{III} + PN....

1. Activation du peroxynitrite par l'isoforme inductible des NO-synthases :	53
1.1. Introduction sur le peroxynitrite :	53
1.1.1. Devenir du PN en solution aqueuse et en conditions physiologiques :	53
1.1.1.1. Dépendance au pH	54
1.1.1.2. Réaction du PN avec le CO_2	55
1.1.1.3. Autres paramètres influençant la décomposition du PN	56
1.1.2. Activation de la décomposition du PN par un métal :	57
1.1.2.1. Par des métalloporphyrines	57
1.1.2.2. Par des hémoprotéines	58
1.2. Activation du peroxynitrite par iNOSoxy : bilan cinétique	59
1.2.1. Effet de la présence de iNOSoxy sur la cinétique de disparition du PN :	59
1.2.1.1. Effet de la concentration de iNOSoxy	59
1.2.1.2. Observation d'un intermédiaire (I)	60
1.2.2. Effet du pH	60
1.2.3. Effet de la concentration en PN	60
1.2.4. Effet de la présence de CO_2	61
1.2.5. Influence de l'environnement de l'hème	62
1.3. Réactivité du système {peroxynitrite + iNOSoxy} :	63
1.3.1. Réaction d'oxydation à deux électrons	63
1.3.2. Réaction d'oxydation à un électron	64
1.3.3. Réaction de nitration	65
1.3.4. Autres réactions liées au PN	66
1.4. Discussion et perspectives	67

2. Investigations mécanistiques :	71
2.1. Etude cinétique de l'intermédiaire (I) en fonction de la concentration de PN et du pH :	71
2.1.1. [PN]	72
2.1.2. pH	73
2.2. Analyse de la réaction d'activation d'un excès de PN par iNOSoxy à différentes valeurs de pH :	75
2.2.1. A pH 6,4 :	75
2.2.1.1. Description des trois phases de la réaction	75
2.2.1.2. Présentation d'un nouveau modèle réactionnel	76
2.2.1.3. Autres observations	77
2.2.2. A pH 8,4 :	77
2.2.2.1. Description des trois phases de la réaction	78
2.2.2.2. Validation du modèle réactionnel et ouverture	78
2.3. Modélisation de l'évolution des constantes cinétiques de formation de (I) en fonction du pH suivant le nouveau modèle réactionnel	80
2.4. Analyse de la réaction d'activation d'un équivalent stoechiométrique de PN par iNOSoxy à différentes valeurs de pH	82
2.5. Discussion et perspectives	84
3. Conséquence de l'activation du peroxy-nitrite sur l'intégrité structurale et fonctionnelle de iNOSoxy :	88
3.1. Mise en évidence d'une oxydation auto-catalytique de iNOSoxy :	88
3.1.1. Modification du spectre d'absorption UV-visible de iNOSoxy	88
3.1.2. Altération de la cystéine proximale et de l'environnement distal de l'hème	89
3.1.3. Réversibilité et protection de iNOSoxy par la présence du substrat Arg...	90
3.2. Mise en évidence d'une nitration auto-catalytique de iNOSoxy :	91
3.2.1. Par immuno-précipitation	91
3.2.2. Par spectroscopie Raman de résonance	92
3.2.3. Par HPLC	94
3.2.4. Par spectrométrie de masse	96
3.3. Mise en évidence de la dégradation progressive de iNOSoxy :	97
3.3.1. Caractérisation des espèces Fe^{III} de iNOSoxy	97
3.3.2. Caractérisation de iNOSoxy modifiée	98
3.4. Activité de iNOSoxy après activation du PN :	100
3.4.1. Activité NO synthase	100
3.4.2. Activation du PN	101
3.4.3. Protection de iNOSoxy par la présence de cibles	101
3.5. Discussion et perspectives	102
4. Comparaison avec les isoformes neuronale et bactérienne de NO-synthase :	105
4.1. Cinétiques d'activation du peroxy-nitrite par nNOSoxy et bsNOS	105
4.2. Analyse des phases observées lors de l'activation d'un excès de PN par les isoformes neuronale et bactérienne de NOS :	106
4.2.1. Pour l'isoforme neuronale	106
4.2.2. Pour l'isoforme bactérienne	107
4.3. Réactivité du peroxy-nitrite activé par nNOSoxy et bsNOS :	109
4.3.1. Réactions d'oxydation à deux et un électrons, réaction de nitration	109
4.3.2. Autres réactions	110

4.4. Conséquences de l'activation d'un excès de peroxy-nitrite par nNOSoxy et bsNOS :	111
4.4.1. Modifications observées en spectroscopie d'absorption UV-visible.....	111
4.4.2. Activité des NOSs après activation du PN.....	112
4.4.3. Détection de nitrotyrosines.....	113
4.5. Discussion et perspectives.....	114
Chapitre IV. Caractérisation du complexe Fe^{II}-NO.....	116
1. Etude du potentiel d'oxydoréduction du couple Fe ^{II} -NO/Fe ^{III} -NO de iNOSoxy :	117
1.1. Evolution du potentiel d'oxydoréduction du couple Fe ^{II} /Fe ^{III} de iNOSoxy en fonction de l'environnement de l'hème et du pH :	117
1.1.1. Etude du médiateur : la phénosafranine.....	118
1.1.2. Etude des espèces HS de iNOSoxy :	119
1.1.2.1. iNOSoxy +Arg/+H ₄ B.....	119
1.1.2.2. iNOSoxy +Arg/+H ₂ B.....	121
1.1.2.3. iNOSoxy +H ₄ B.....	122
1.2. Difficultés liées à la mesure du potentiel d'oxydoréduction du couple Fe ^{II} -NO/Fe ^{III} -NO :	124
1.2.1. Etude de la stabilité des médiateurs.....	125
1.2.2. Expérience d'oxydoréduction du couple Fe ^{II} -NO/Fe ^{III} -NO de iNOSoxy..	125
1.3. Discussion et perspectives.....	127
2. Propriétés spectroscopiques de l'espèce Fe ^{II} -NO :	130
2.1. Caractérisation en spectroscopie RPE classique des différents complexes Fe ^{II} -NO de iNOSoxy.....	130
2.2. Etude des différentes géométries du complexe Fe ^{II} -NO des NOSs :	131
2.2.1. Etude de la saturation des différents complexes Fe ^{II} -NO de iNOSoxy +Arg/+H ₄ B : mise en évidence d'une troisième géométrie.....	133
2.2.1.1. Hypothèses.....	133
2.2.1.2. Détermination des paramètres de saturation de la forme (1).....	133
2.2.1.3. Détermination des paramètres de saturation de la forme (2).....	134
2.2.1.4. Décomposition du spectre RPE de Fe ^{II} -NO.....	134
2.2.2. Etude de l'évolution du spectre RPE des différents complexes Fe ^{II} -NO de iNOSoxy +Arg/+H ₄ B en fonction de la température.....	135
2.2.3. Influence de l'environnement de l'hème.....	137
2.3. Caractérisation par spectroscopie RPE à impulsions des interactions formées par le complexe Fe ^{II} -NO dans la poche de l'hème.....	138
2.4. Discussion et perspectives.....	140
Chapitre V. Conclusions générales.....	142

Annexes.....	147
1. Surexpression et purification de iNOSoxy.....	148
2. Spectrométrie de masse :.....	150
2.1. Principe.....	150
2.2. Masses des 51 fragments obtenus après digestion de iNOSoxy par la trypsine.....	153
3. Principe de la spectroscopie Raman de résonance.....	155
4. Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) :.....	157
4.1. Principe.....	157
4.2. Détermination des paramètres de saturation des formes (1) et (2) du complexe Fe ^{II} -NO de iNOSoxy +Arg/+H ₄ B.....	160
4.3. Principe de la spectroscopie RPE à impulsions.....	161
5. Elaboration des équations cinétiques :.....	162
5.1. Pour la modélisation de k _{obs} avec intervention d'un seul groupe protonable.....	162
5.2. Pour la modélisation de k _{obs} avec intervention de deux groupes protonables.....	164
6. Analyse cinétique détaillée de la réaction stoechiométrique entre PN et iNOSoxy :.....	168
6.1. A pH 6,5.....	168
6.2. A pH 8,0.....	169
7. Détermination du potentiel E _½ du couple Fe ^{II} /Fe ^{III} de iNOSoxy :.....	171
7.1. iNOSoxy +Arg/+H ₂ B à pH 8,42.....	171
7.2. iNOSoxy +H ₄ B à pH 6,48.....	173
Références bibliographiques.....	175

Articles.

Chapitre I.
Introduction Générale

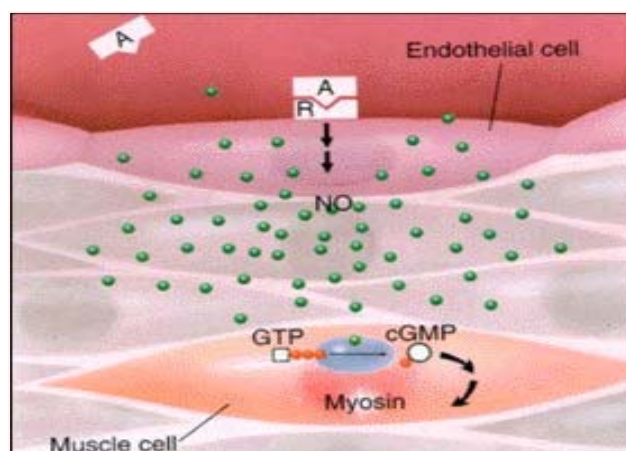


Figure I.1. NO dans les endothéliums (image issue du site internet www.nobelprize.org).

La découverte du premier rôle biologique du monoxyde d'azote (NO), par Ferid Murad en 1976, a été l'élément déclencheur d'une véritable révolution scientifique. En effet, trente ans plus tard, plus de 75 000 publications rapportent l'importance de cette petite molécule radicalaire dans des processus physiologiques très variés [1]. Ainsi, en 1998, le prix de Nobel de médecine ou de physiologie a été décerné à trois chercheurs américains, Robert I. Furchgott, Louis J. Ignarro et Ferid Murad, pour leurs travaux de recherche sur le rôle du NO dans le système cardiovasculaire. Le NO suscite toujours aujourd'hui l'intérêt de nombreuses équipes de recherche, ainsi que l'enzyme qui assure sa biosynthèse : la NO-synthase (NOS).

1. NO : entre signalisation et cytotoxicité.

Chez les mammifères, NO est impliqué dans des processus physiologiques variés, intrinsèquement liés à son lieu de biosynthèse. En effet, lorsqu'il est synthétisé au niveau des endothéliums ou au niveau post-synaptique des neurones, NO entre dans la voie de signalisation de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Cependant, lorsqu'il est synthétisé au sein des macrophages, NO est un acteur de la réponse immunitaire non spécifique. Ainsi paradoxalement, les fonctions biologiques du NO se répartissent entre signalisation et cytotoxicité.

1.1. Rôles physiologiques du monoxyde d'azote : NO *in vivo*.

NO est une molécule hydrosoluble et lipophile qui a la capacité de diffuser dans de nombreux compartiments cellulaires.

1.1.1. dans le système cardiovasculaire :

C'est dans ce système qu'a été découvert le premier rôle physiologique du NO [2-4].

Dans les endothéliums, la production de NO est activée par un influx de calcium. Celui-ci peut être induit en réponse à différents stimuli hormonaux (bradykinine, histamine, thrombine et sérotonine), mais est principalement régulé par un processus dynamique lié aux forces de frottement exercées par le flux sanguin [5].

Lorsque NO est produit au niveau des endothéliums (fig. I.1), et en particulier dans les parois internes des vaisseaux sanguins, il va diffuser jusqu'aux cellules de muscle lisse pour atteindre une enzyme appelée la guanylate cyclase soluble (GCs). La GCs possède un centre hémique ferreux (Fe^{II}) auquel peut se fixer NO, entraînant la perte du ligand proximal

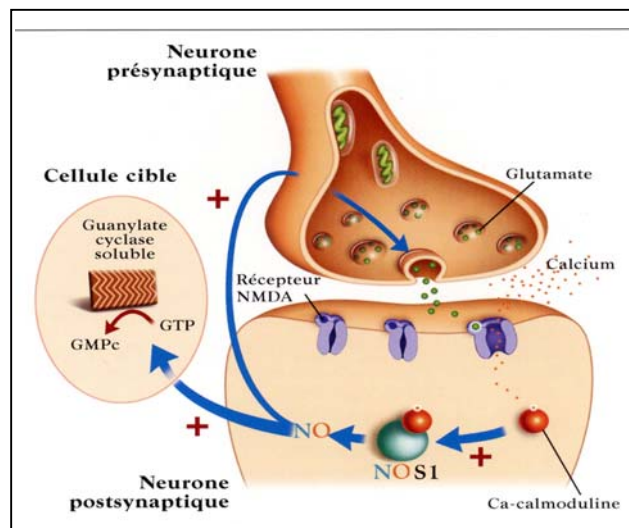


Figure I.2. NO dans les systèmes nerveux central et périphérique.

histidine et un changement de conformation de la protéine [6]. La GCs est alors active pour la transformation de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc). La libération de GMPc induirait ensuite l'activation de protéines kinases (protéine kinase G, PKG), suivie d'une cascade d'évènements cellulaires menant à la désensibilisation de la myosine au calcium, avec pour effet de provoquer la relaxation des muscles lisses : c'est la vasodilatation.

Ainsi en tant qu'activateur de la GCs, NO contrôle le tonus musculaire, mais il prévient également l'adhésion des monocytes et l'agrégation des plaquettes [7, 8].

1.1.2. au niveau des systèmes nerveux central et périphérique :

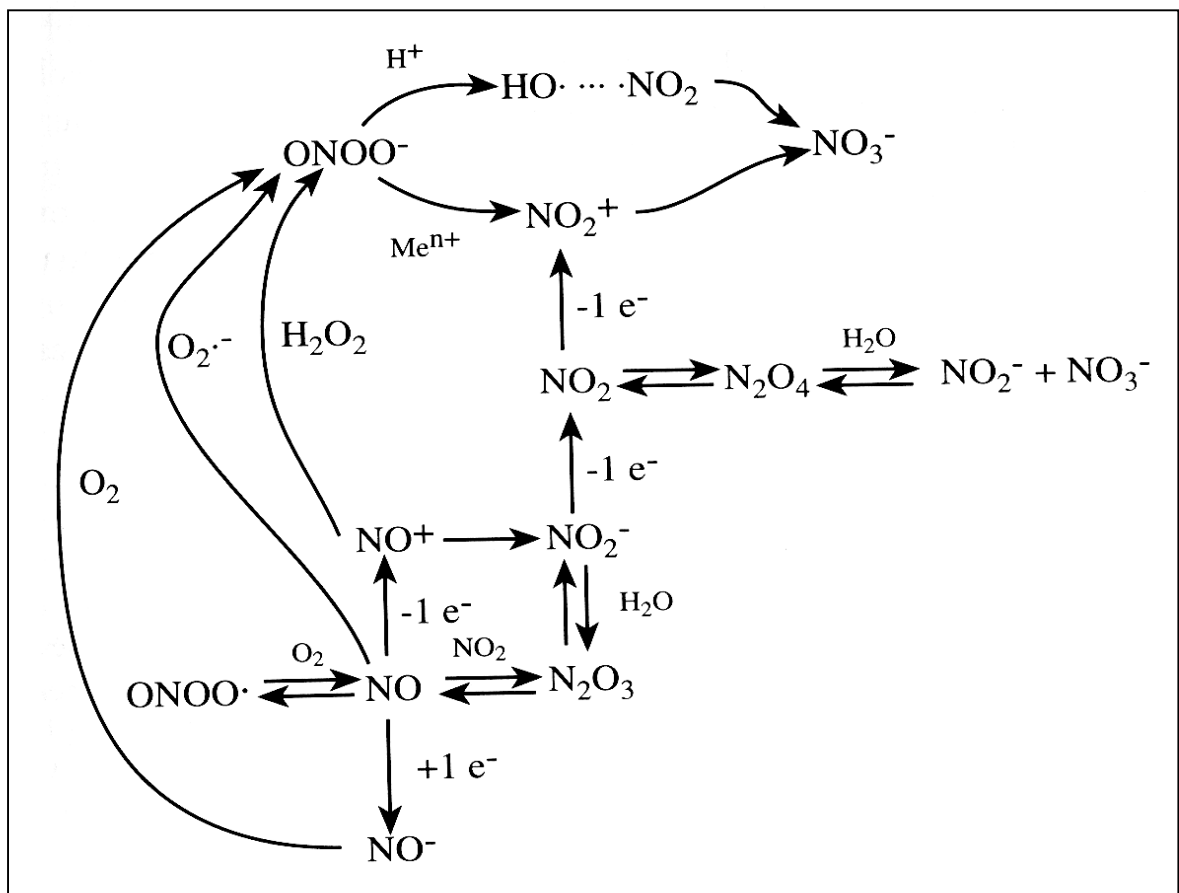
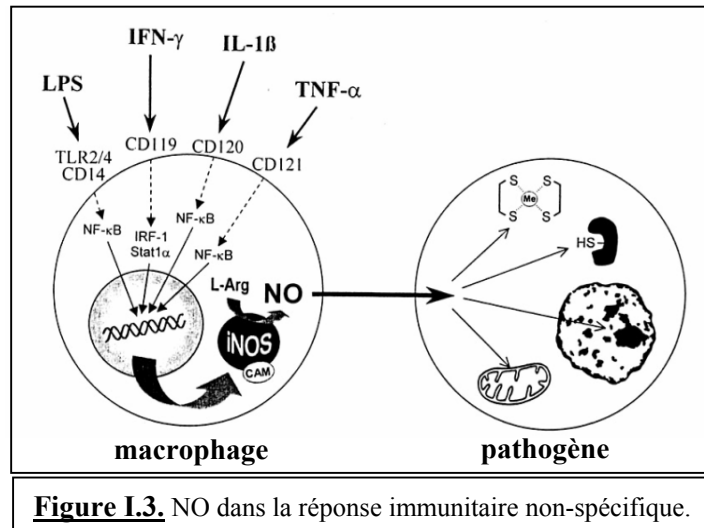
L'influx nerveux induit la libération de glutamate par le neurone pré-synaptique dans l'espace synaptique, qui va être capté par des récepteurs spécifiques (N-méthyl-D-aspartate, NMDA) du neurone post-synaptique (fig. I.2). Ceci provoquerait l'ouverture de canaux ioniques permettant un influx de calcium et la propagation de l'influx nerveux au neurone post-synaptique. L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium induirait la synthèse de NO dans le neurone post-synaptique. Ce NO diffuserait alors vers le neurone pré-synaptique où il élèverait le niveau de GMPc par activation de la GCs, comme précédemment décrit (voir 1.1.1.). Ceci aurait pour effet d'augmenter la libération de glutamate et donc d'augmenter la transmission synaptique. Ces phénomènes, qualifiés de potentialisation ou de dépression à long terme, sont des mécanismes utilisés par les neurones pour « se souvenir » des signaux antérieurs et modifier leurs activités.

Ainsi, au niveau du système nerveux central, NO est impliqué dans des phénomènes de mémorisation, d'apprentissage, et participe entre autres à la régulation de la signalisation et de la plasticité synaptique [5, 9-11].

Par ailleurs, au niveau du système nerveux périphérique, NO agit en tant que pur neurotransmetteur ou modulateur des fibres nerveuses dites non-adrénergiques non-cholinergiques (NANC) et participerait par son action relaxante à la régulation du transit gastro-intestinal, à la fonction respiratoire et à la fonction érectile [5, 12]. Enfin le NO, *via* le système NANC, pourraient également être impliqué dans la perception de la douleur [13].

1.1.3. dans le système immunitaire :

La production de NO au sein des macrophages est un des mécanismes de la réponse immunitaire non-spécifique, pour lutter contre la présence d'un pathogène au sein de l'organisme. Différents stimuli peuvent induire cette production de NO [14]. Par exemple, les



liposaccharides (LPS), qui constituent la paroi des bactéries gram-négatives, provoquent une cascade de réponses activant des kinases telles que les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), des facteurs nucléaires κB (NF- κB) ou encore la libération de cytokines comme l'interleukine 1 (IL-1) (fig. I.3). Les cytokines pro-inflammatoires libérées par des cellules infectées, telles que les interférons γ (IFN- γ) ou les facteurs de nécrose tumorale α (TNF- α), peuvent également induire la production de NO par le macrophage [15].

L'exposition prolongée de la cellule cible à de fortes concentrations de NO peut conduire à l'inhibition de plusieurs enzymes de son cycle respiratoire tels que la cytochrome c oxydase des mitochondries pour les eucaryotes ou le cytochrome bd pour les procaryotes [16, 17]. De plus, NO peut bloquer la synthèse d'ADN des bactéries par inhibition des nucléotides réductases [18].

Par ailleurs, NO pourrait également être un agent anti-viral par inhibition de la machinerie permettant au virus de se multiplier et de proliférer [19] ou encore être responsable de l'activité cytostatique des macrophages sur les tumeurs [20].

Tous ces processus toxiques pour l'agent pathogène sont liés à la biosynthèse de NO mais sont cependant dus à une réactivité secondaire de NO plutôt qu'au NO lui-même. En effet, NO proprement dit est relativement inerte face aux biomolécules. Par ailleurs, il est susceptible de réagir avec d'autres produits des macrophages ou du milieu cellulaire, tels que l'oxygène, le radical superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène, pour former des espèces au pouvoir hautement oxydant : les formes réactives de l'azote ou RNSs (*reactive nitrogen species*) [21].

1.2. NO et les formes réactives de l'azote (RNSs) :

La figure I.4 présente les RNSs et les réactions qui mènent à leur formation à partir de NO. Tout d'abord, selon l'environnement, NO peut se trouver sous sa forme réduite NO^- ou oxydée NO^+ . L'anion nitroxyle (NO^-) dimérise rapidement pour former l'oxyde nitreux N_2O . Cependant sous sa forme protonée HNO, il peut réagir avec des thiols, participer à des réactions d'oxydation de l'ADN ou encore nitrosyler les hèmes ferriques (Fe^{III}) [22, 23]. Le cation nitrosonium (NO^+), lui, est un agent nitrosant et intervient dans des réactions d'addition ou de substitution électrophile, la plus courante étant la S-nitrosation des thiols [24].

La réaction de S-nitrosation, qui réside dans le transfert d'un cation NO^+ sur des groupements thiols (glutathion, cystéine) est également permise à partir des trioxyde et tétraoxyde d'azote, N_2O_3 et N_2O_4 , formés à partir de NO [20]. Etant donné que les nitrosothiols ont une durée de

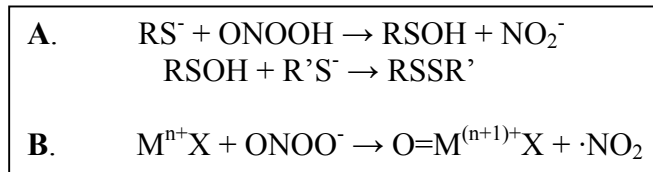


Figure I.5. Réactions d'oxydation à deux et un électrons du peroxynitrite avec des thiols (A) et des métaux de transitions (B) pouvant appartenir à des protéines.

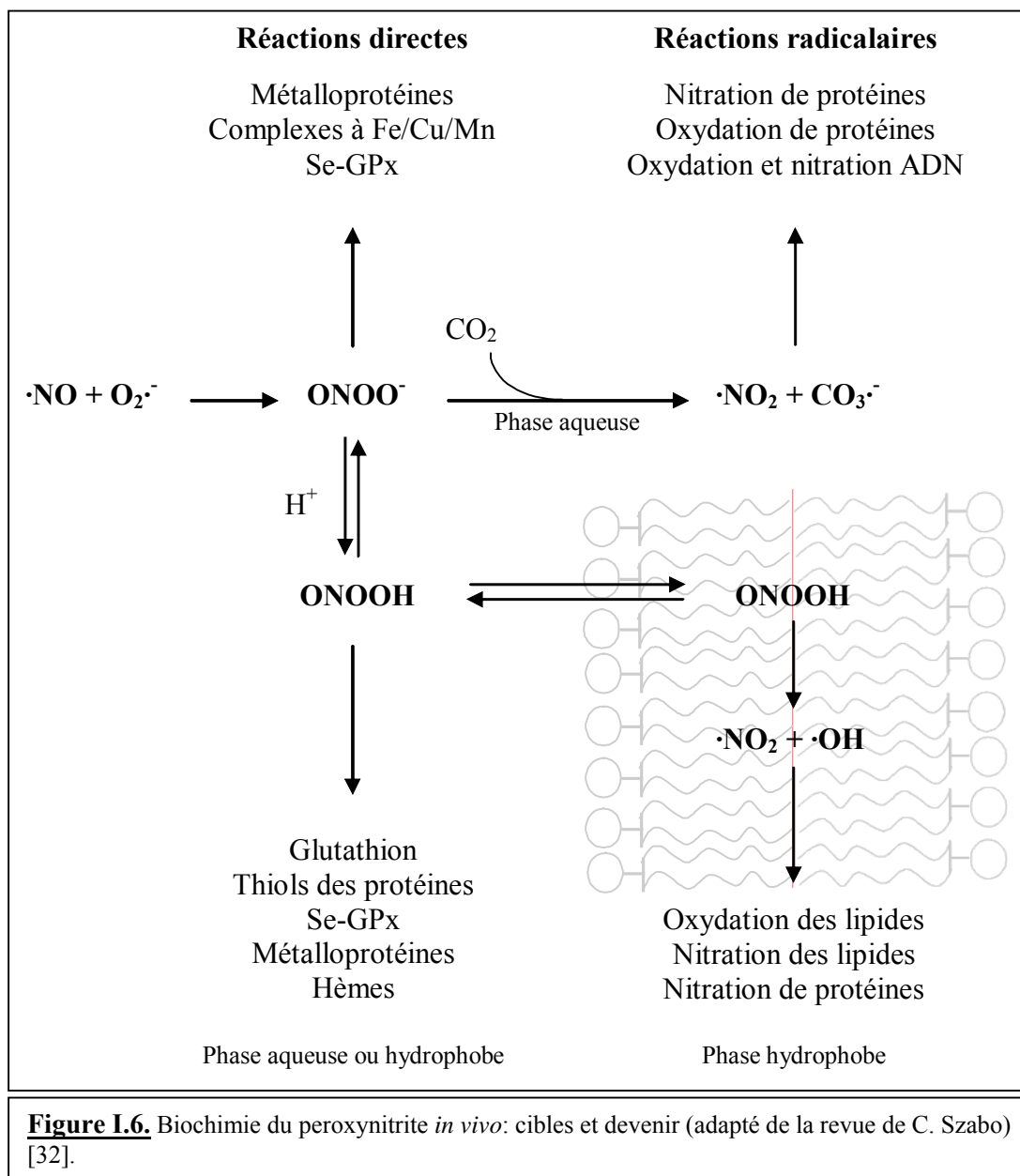


Figure I.6. Biochimie du peroxynitrite *in vivo*: cibles et devenir (adapté de la revue de C. Szabo) [32].

de demi-vie très longue (de quelques minutes à plusieurs heures) et qu'ils sont potentiellement des donneurs d'oxydes d'azote (NO^+ , NO), l'hypothèse d'un rôle physiologique de ces composés émerge. Par ailleurs, il a récemment été postulé que la modification de l'activité de certaines protéines, par nitrosation de résidus cystéine clefs, puisse être comparable à la réaction de phosphorylation des voies de signalisation [25].

Ensuite, NO peut former des composés capables de nitration, tels que le cation nitrile (NO_2^+) ou le dioxyde d'azote ($\cdot\text{NO}_2$), avec pour cible tout groupe aromatique porté par une biomolécule (résidus tyrosine, tryptophane, phénylalanine des protéines) ou encore des thiols. La nitration des protéines enzymatiques, sur des résidus clefs, peut induire soit leur inhibition, soit une modification de leur activité [26, 27]. Cependant, l'activité de nitration est principalement observée en conditions de stress oxydant et a été associée à tout un panel de pathologies [21].

Enfin la forme la plus réactive de l'azote, et très certainement la plus nocive *in vivo*, est le peroxy-nitrite (ONOO^- , PN). Il est formé par la réaction strictement stoechiométrique d'un anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) avec une molécule de NO , uniquement contrôlée par la diffusion ($\approx 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) [28-30]. Jusqu'à présent, il est postulé que les sites de formation du PN soient intrinsèquement associés à ceux du superoxyde (NAD(P)H-oxydases de la membrane plasmique ou complexes de la chaîne respiratoire des mitochondries). En effet, si NO est relativement stable et peut diffuser rapidement dans les différents compartiments cellulaires, les ions superoxyde ont une durée de vie beaucoup plus faible et diffusent de manière très restreinte dans les membranes biologiques. Ainsi, *in vivo*, c'est à proximité des macrophages et des mitochondries que la production de PN apparaît comme pouvant être la plus significative.

Le peroxy-nitrite, PN, est un composé chimique au fort potentiel oxydant ($E^\circ (\text{ONOOH}, \text{H}^+/\text{NO}_2^{\cdot-}, \text{H}_2\text{O}) = 1,4 \text{ V}$) [31]. Il a fait l'objet d'une attention particulière ces dernières années du fait de sa capacité à oxyder et nitrer diverses biomolécules et d'excellentes revues rapportent l'implication directe du PN dans de nombreuses pathologies [21, 32]. Parmi les réactivités les mieux décrites du PN, nous citerons les réactions d'oxydation à 2 et 1 électrons avec les thiols et les métaux de transition (fig. I.5), conduisant dans un cas à la formation de ponts disulfure, et dans l'autre à des complexes métalliques à haut degré d'oxydation accompagnés de radicaux $\cdot\text{NO}_2$ qui peuvent entraîner des réactions secondaires radicalaires, dont la réaction de nitration. De plus, de nombreuses biomolécules peuvent être oxydées et/ou nitrées par les radicaux dérivés du PN, comme les résidus tyrosine des protéines, les thiols, les phospholipides ou encore l'ADN qui peut subir des clivages dans ses formes simples et

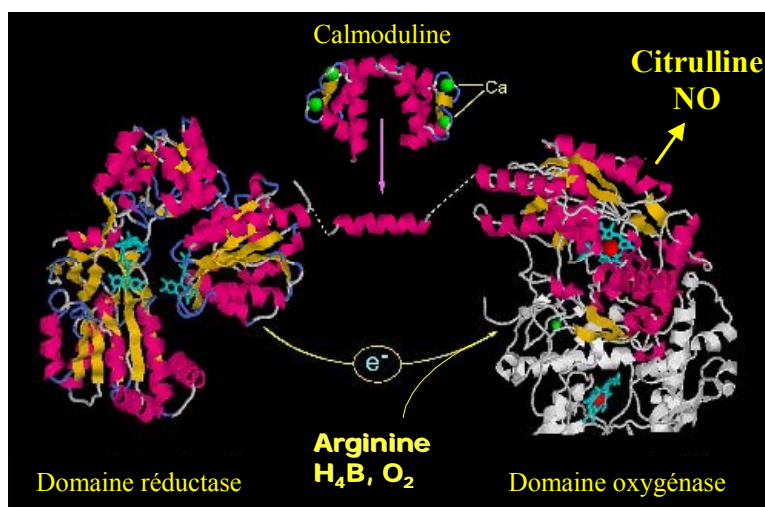


Figure I.7. Représentation schématique d'un monomère de NO-synthase (adapté de la page internet de S. Daff).

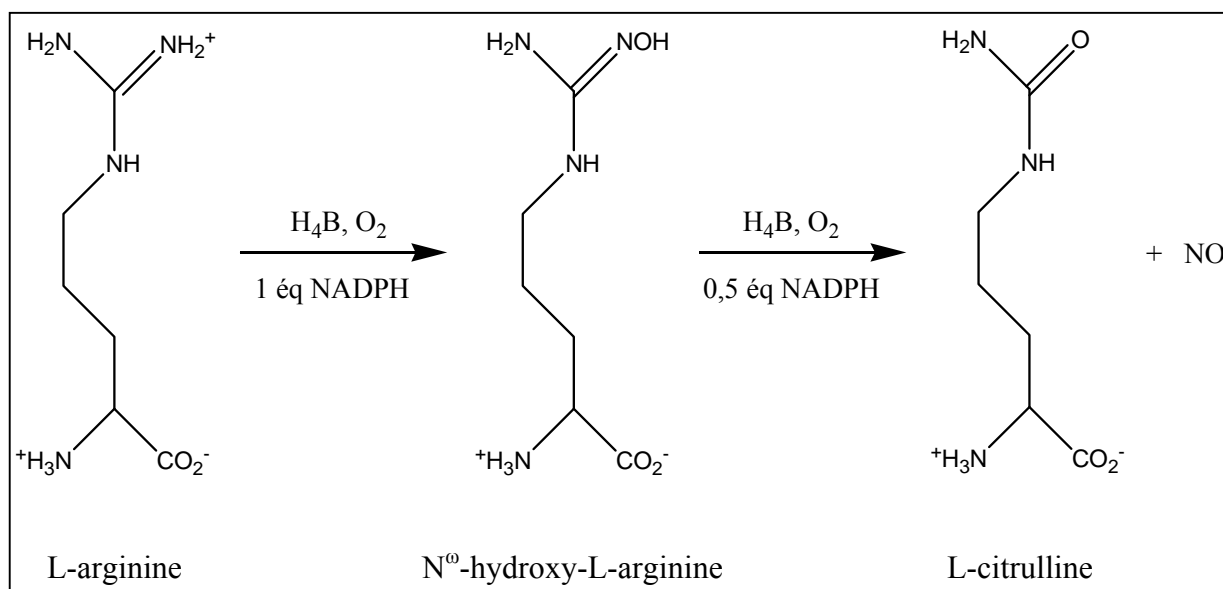


Figure I.8. Réaction d'oxydation du substrat L-arginine par les NO-synthases, conduisant à la formation d'une molécule de L-citrulline et d'une molécule de NO.

doubles brins (fig. I.6). Cependant, PN est également un élément chimique très instable qui, à pH physiologique, va rapidement se décomposer en nitrites et nitrates, éléments inertes pour la cellule. En effet, seuls 7 % du PN conduiraient à des réactions d'oxydation ou de nitration de protéine. Ainsi *in vivo*, PN a besoin d'être « activé » pour former les espèces radicalaires toxiques pour la cellule, et c'est le CO₂ du milieu qui, majoritairement, jouerait ce rôle.

Quelles que soient les espèces réactives de l'azote considérées, et quelles que soient leurs rôles physiologiques (signalisation ou cytotoxicité), toutes sont issues de la réaction de biosynthèse de NO.

2. Les NO-synthases : unique source de NO chez les mammifères.

L'unique source de NO chez les mammifères est une famille d'enzymes appelées les NO-synthases (NOSs), identifiée pour la première fois en 1990 [33, 34].

2.1. Généralités :

Les NOSs de mammifères ont toutes la même structure. Elles sont actives sous forme de dimères, chaque monomère étant constitué d'un domaine réductase et d'un domaine oxygénase (fig. I.7).

2.1.1. Les monomères de NOS :

Le domaine réductase (NOS_{réd}). C'est la partie C-terminale de la NOS. Très similaire au domaine réductase des cytochromes P450 (≈ 50 % d'homologie), son rôle est d'assurer le transfert des électrons de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite (NADPH), *via* les co-facteurs flavine adénine dinucléotide (FAD) et flavine mononucléotide (FMN), vers le domaine oxygénase où se situe le site catalytique [35-37].

Le domaine oxygénase (NOS_{oxy}). C'est la partie N-terminale de la NOS. Il comporte les sites de fixation pour l'hème, le co-facteur (6R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (H₄B) et le substrat L-arginine. L'hème est une protoporphyrine de type IX, avec un atome de fer ferrique (Fe^{III}) au centre, qui fixe une cystéine en ligand proximal et une molécule d'eau en ligand distal. C'est au sein du domaine oxygénase qu'en présence de dioxygène (O₂), NOS réalise l'oxydation en deux étapes du substrat L-arginine (Arg) en L-citrulline (Cit) avec production concomitante d'une molécule de NO (fig. I.8).

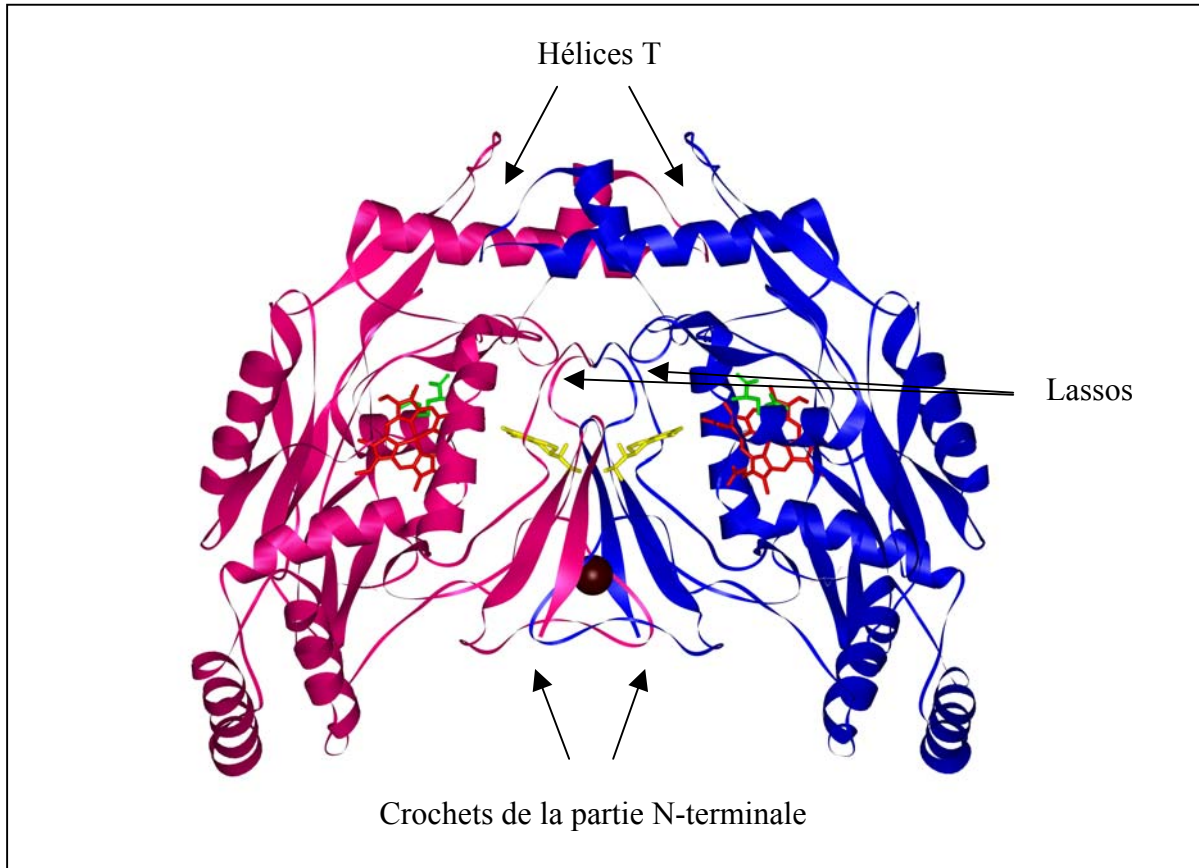


Figure I.9. Représentation de la structure en dimère des monomères oxygénase de l'isoforme inducible de NOS humaine (iNOSoxy) [50]. Chaque monomère (l'un rose, l'autre bleu) comporte un hème (rouge), une molécule de H₄B (jaune), et une molécule de substrat Arg (vert). A l'interface se trouvent les crochets de la partie N-terminale, le lasso et le *cluster* de zinc (atome de zinc en marron).

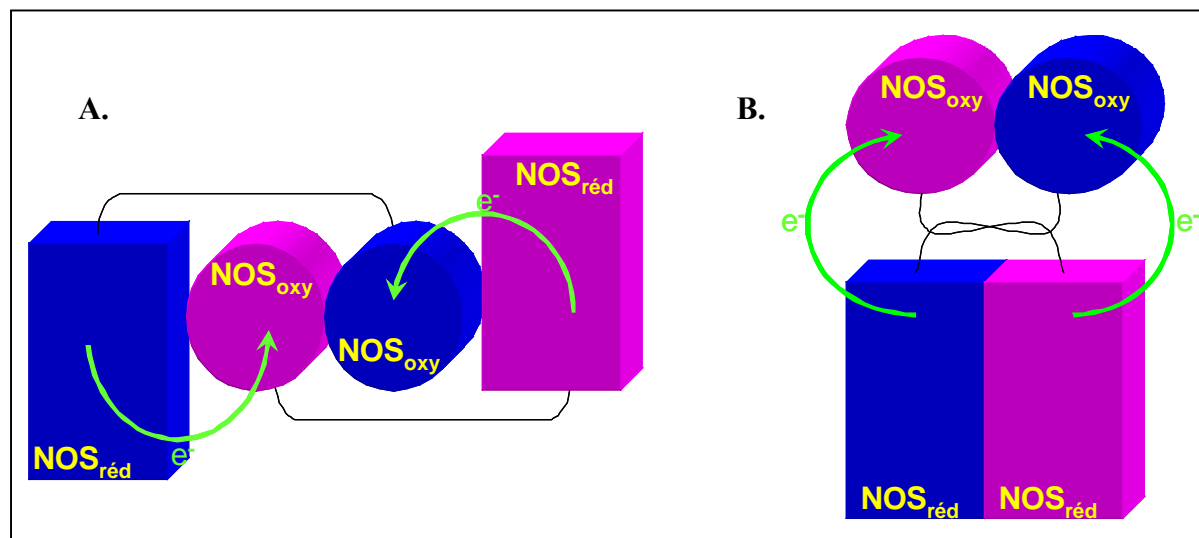


Figure I.10. Illustration du transfert d'électrons croisé au sein d'un dimère de NOS. Les électrons du domaine réductase d'un monomère sont transférés au domaine oxygénase de l'autre monomère. **A.** Chemin proposé dans le cas de la seule dimérisation des domaines oxygénase de NOS. **B.** Chemin proposé dans l'hypothèse d'une dimérisation des domaines oxygénase et des domaines réductase.

L'interdomaine. NOS_{réd} et NOS_{oxy} sont reliés par un domaine d'une trentaine d'acides aminés permettant la fixation de la calmoduline (CaM) (fig. I.7). Cette petite protéine de 17 kDa est un senseur de Ca^{2+} , et sa fixation à NOS permet le transfert des électrons de NOS_{réd} à NOS_{oxy}. Ce mode d'activation des NOSs n'est toujours pas élucidé, mais il semble cependant qu'il soit plus d'ordre cinétique et allostérique que thermodynamique, puisque les potentiels des flavines ne sont pas affectés par la fixation de CaM [37-40]. Une des hypothèses proposées réside dans un changement de conformation de la NOS qui aurait pour effet de rapprocher le domaine FMN de l'hème [41].

2.1.2. Les dimères de NOS :

Les NOS sont actives pour la biosynthèse de NO sous forme de dimères [42, 43]. Cette ultime structuration des NOSs se fait entre domaines oxygénase de monomères. Ainsi elle requiert la présence de l'hème [44, 45], et est facilitée en présence du co-facteur H₄B et du substrat Arg qui ont pour effet de renforcer et de bloquer la conformation dimérique [46-48]. Par ailleurs, l'hypothèse d'une dimérisation des domaines réductase de certaines isoformes de NOS émerge [49]. La figure I.9 présente la structure en dimère des NOS_{oxy}, avec son axe de symétrie très marqué, les hélices en T qui délimitent en haut le domaine oxygénase et la structure en lasso hélicoïdal (*helical lariat*) au centre qui constitue une grande partie de la surface de dimérisation [50]. Ce lasso interagit avec les co-facteurs H₄B de chaque monomère, ainsi qu'avec leurs extrémités N-terminales en forme de crochets.

En bas de la surface de dimérisation se trouve un atome de zinc coordonné par 4 résidus cystéine, deux de chaque monomère NOS_{oxy} [51]. Les structures cristallographiques de NOS_{oxy} ayant été obtenues avec et sans zinc, la question se pose toujours de savoir si il est un élément constitutif des NOSs *in vivo*. Par ailleurs cette variabilité suggère que ce site puisse être sensible à la protéolyse ou encore avoir un rôle allostérique de régulation [50, 52, 53]. L'atome de zinc interagit avec les crochets N-terminaux et contribue à la stabilisation du dimère ainsi qu'à l'intégrité du site de fixation du co-facteur H₄B. Cependant, il ne semble essentiel ni à l'activité des NOSs ni à leur structuration en dimère puisqu'en absence de zinc, les cystéines forment des ponts disulfures qui maintiennent la conformation dimérique [54, 55].

Dans le cas des NOSs, le transfert des électrons du domaine réductase au domaine oxygénase se fait préférentiellement de manière croisée, c'est-à-dire que NOS_{réd} du monomère (1) transfère ses électrons à NOS_{oxy} du monomère (2), et que NOS_{réd} (2) donne ses électrons à NOS_{oxy} (1). La figure I.10 présente les deux chemins proposés pour le transfert des électrons

	eNOS	nNOS	iNOS
Poids moléculaire	131 kDa	161 kDa	133 kDa
Taille (acides aminés)	1153 aa	1434 aa	1203 aa
Type cellulaire	Endothélium Epithélium cardiomyocyte	Neurone Muscle squelettique	Macrophage Hépatocyte, astrocyte, Muscle lisse
Expression	Constitutive	Constitutive	Inductible (cytokines, LPS)
Localisation subcellulaire, adressage	Calveolae Golgi	Variable, Membrane post- synaptique	Cytosol
Régulation de l'activité	[Ca ²⁺] dépendante	[Ca ²⁺] dépendante	[Ca ²⁺] indépendante
Stabilité dimère	eNOS > nNOS > iNOS		
Vitesse de transfert d'électrons	nNOS > iNOS > eNOS		
k _{cat} (/min/dimère)	28	256	390

Table I.1. Principales caractéristiques des formes prédominantes des trois isoformes de NOS de mammifère : la NOS endothéliale (eNOS), neuronale (nNOS) et inducible (iNOS). Sont spécifiés la stabilité relative des dimères formés par les différentes isoformes [47], le classement des NOSs en fonction de la vitesse du transfert des électrons de NOS_{red} à NOS_{oxy} [76, 96, 97, 103], et l'efficacité catalytique (k_{cat}, par minute par dimère de NOS) de chaque isoforme pour la transformation du substrat Arg en Cit + NO [48, 56].

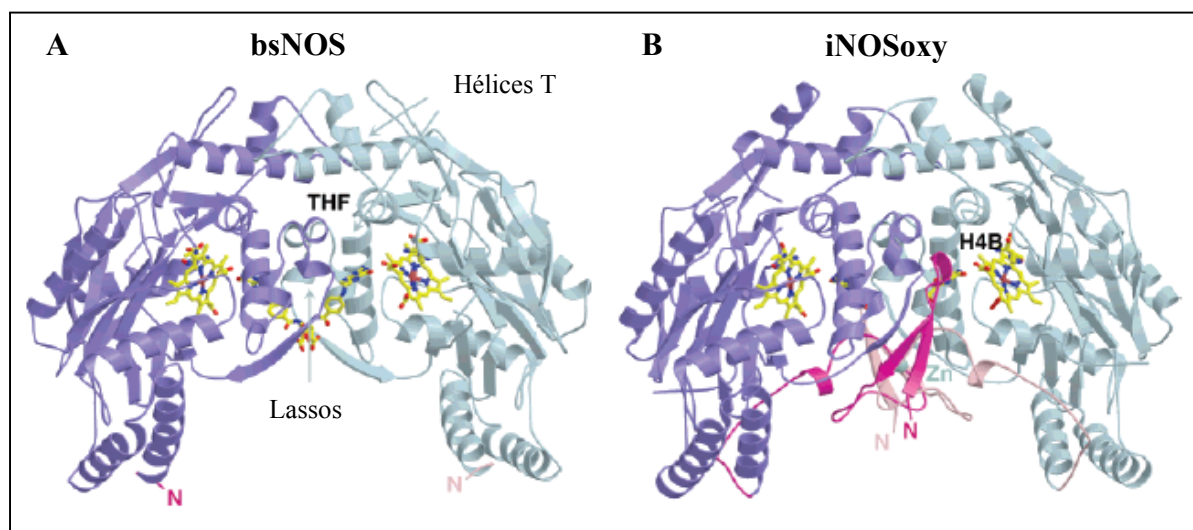


Figure I.11. Comparaison des structures des dimères de protéine NOS-like de *Bacillus subtilis* cristallisée avec le tétrahydrofolate (THF) (A, bsNOS) et des domaines oxygénase de l'isoforme inducible de mammifère cristallisés avec leur co-facteur naturel H4B (B, iNOSoxy).

au sein d'un dimère de NOS suivant la dimérisation des domaines oxygénase seule (fig. I.10-A) [57], ou accompagnée de celle des domaines réductase (fig. I.10-B) [41].

2.2. Les différentes isoformes de NO-synthase :

2.2.1. Les trois NOSs principales de mammifères :

Chez les mammifères, trois isoformes principales de NOS ont été isolées : la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neuronale (nNOS) et la NOS inductible des macrophages (iNOS). Elles sont exprimées à partir de gènes distincts qui présentent $\approx 60\%$ d'homologie de séquence et leurs structures quaternaires sont quasi-superposables [52]. La table I.1 présente certaines caractéristiques de ces isoformes de NOS de mammifère.

Les NOSs endothéliale et neuronale ont en commun leurs modes d'expression et de régulation dont iNOS se démarque [9, 58, 59]. En effet, l'expression de eNOS et nNOS est constitutive tandis que celle de iNOS est induite par des stimuli de l'inflammation (cytokines, LPS). Ensuite, les NOSs dites constitutives (eNOS, nNOS) requièrent une concentration de l'ordre du μM en calcium pour fixer CaM, et ainsi permettre le transfert des électrons de $\text{NOS}_{\text{réd}}$ à NOS_{oxy} [60]. iNOS, elle, présente une grande affinité pour CaM ($<[\text{Ca}^{2+}]_{\text{physio}}$) ce qui rend permanent le transfert d'électron [61]. De plus, il existe chez les NOSs constitutives une séquence de 45 acides aminés avec laquelle interagit CaM lorsque la concentration de calcium est trop faible pour permettre l'interaction avec son domaine de fixation [62]. Il a été proposé que cet insert, inexistant chez iNOS, puisse être un élément d'auto-inhibition des NOSs constitutives, qui empêcherait le transfert des électrons au sein d'un même monomère [41, 63].

2.2.2. Les NOSs de bactéries :

Le séquençage des génomes de plusieurs organismes a permis d'identifier, par comparaison des séquences traduites, des gènes présentant des homologies de séquence avec ceux des NOSs de mammifères. Ainsi, il s'est avéré que de nombreuses bactéries, principalement à Gram positif, possèdent des protéines semblables aux NOSs [64].

Les NOSs de procaryotes n'ont pas de domaine réductase et existent sous forme d'homodimère de domaines oxygénase avec une structure très proche des NOS_{oxy} de mammifères, comme en témoigne la figure I.11 [65, 66]. Ces NOSs doivent donc avoir une autre source d'électrons, et il a récemment été postulé que le système flavodoxine-réductase/flavodoxine des bactéries puisse jouer ce rôle [67]. De plus les bactéries ne

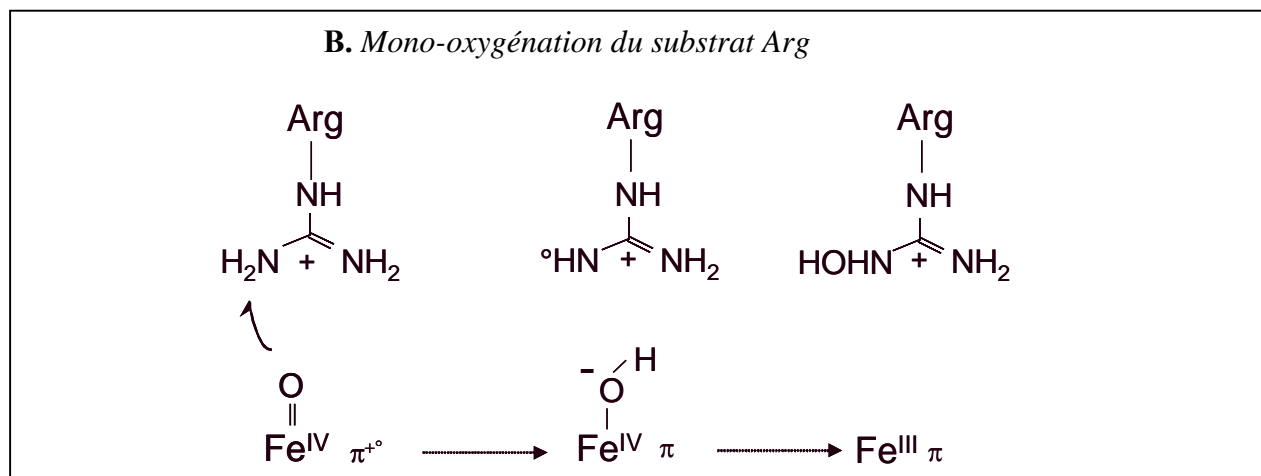
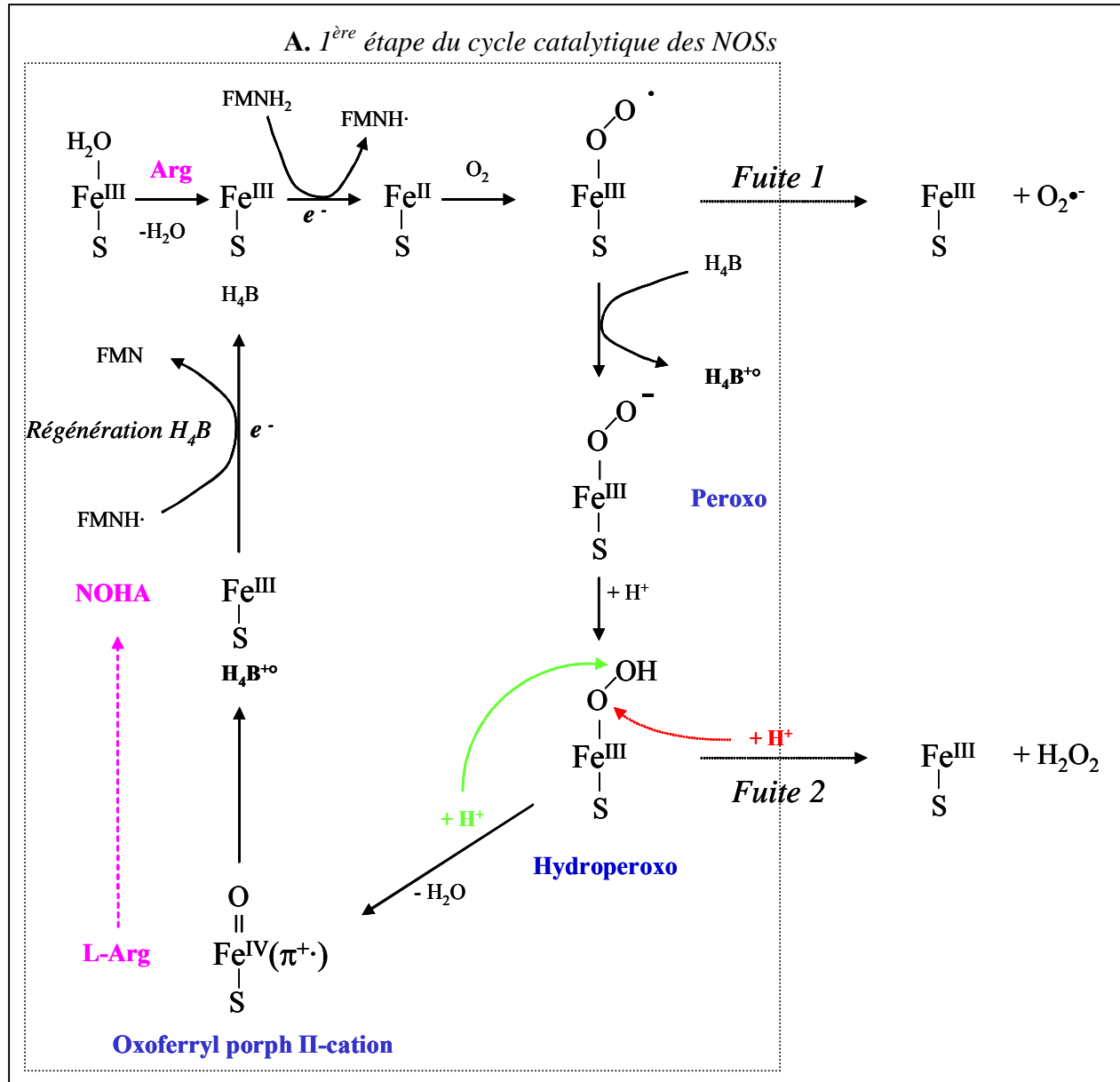


Figure I.12. A. Première étape du cycle catalytique des NOSs. Les deux électrons nécessaires à la réaction proviennent de la consommation d'un équivalent NADPH par le domaine réductase. B. Détail de la réaction de mono-oxygénation du substrat L-arginine (L-Arg) pour former l'intermédiaire N^o-hydroxy-L-arginine (NOHA).

possèdent pas le co-facteur H_4B indispensable à la biosynthèse de NO par les NOSs de mammifères (voir 2.3.1.) qui semble cependant pouvoir être substitué par une autre molécule, le tétrahydrofolate (THF) [68].

Si ces protéines *NOS-like* sont capables de réaliser la biosynthèse de NO en leur site actif, comme les NOSs de mammifères [68], leur fonction physiologique réelle n'est pas encore élucidée. Cependant, *in vivo*, leur activité ne semble pas avoir pour but la production de NO en tant que médiateur biologique. D'une part parce que ces enzymes ne permettent *a priori* pas la libération de NO [69], d'autre part parce qu'aucun système de signalisation pouvant impliquer NO lui-même n'est à ce jour connu chez les procaryotes. Par contre, la NOS retrouvée chez le pathogène responsable de la gale commune de la pomme de terre, *Streptomyces turgidiscabies* (stNOS), catalyserait la nitration, en position 4, d'un groupement tryptophanyle incorporé à la toxine thaxtomine essentielle à son cycle infectieux [70]. Cette activité de nitration régiosélective des tryptophanes a du reste également été mise en évidence *in vitro* pour la NOS de *Deinococcus radiodurans* (deiNOS) associée à une tryptophanyl-tRNA synthétase [71, 72], et apparaît donc comme une première piste pour la détermination du rôle physiologique des NOSs bactériennes.

2.3. Activités des NO-synthases :

L'activité principale des NOSs est la biosynthèse de NO, suivant deux étapes successives de mono-oxygénation. La première étape transforme le substrat L-arginine en l'intermédiaire N^0 -hydroxy-L-arginine (NOHA) ; la seconde étape transforme NOHA en L-citrulline avec libération d'une molécule de NO (voir 2.1.1., fig. I.8).

2.3.1. La biosynthèse de NO :

2.3.1.1. Première étape du cycle catalytique : oxydation de Arg.

Première étape. L'oxydation à deux électrons de la L-arginine en NOHA passe par un mécanisme très similaire à celui des cytochromes P450, à l'intervention du co-facteur H_4B près. Il est présenté figure I.12 [73, 74].

NOS, en absence de substrat et de co-facteur, est à l'état Fe^{III} bas spin avec une molécule d'eau en 6^{ème} ligand. La fixation de Arg et H_4B a pour effet de chasser la molécule d'eau du site actif et d'assurer la transition de l'état de spin du fer vers un état haut spin 5-coordonné.

Dans le cas de iNOS, cette transition entraîne une élévation du potentiel de l'hème de $\approx +100$ mV et permet l'apport d'un premier électron du domaine réductase pour réduire le fer

qui passe de la forme Fe^{III} à Fe^{II} [75]. La vitesse de ce premier transfert d'électron serait l'étape limitante du cycle catalytique des NOSs ($\approx 0,01$ à 3 s^{-1}) et varie d'une isoforme à l'autre (voir table I.1) [74, 76].

Le fer Fe^{II} va alors fixer une molécule de dioxygène (O_2) pour former un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$, équivalent au complexe hème ferrique superoxyde $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2 \leftrightarrow \text{Fe}^{\text{III}}\text{-OO}\cdot]$ [77]. Pour poursuivre son cycle catalytique, la NOS doit pouvoir réduire ce complexe avant qu'il ne s'autoxyde et ne conduise à la libération d'ions superoxyde (fig. I.12-A, fuite 1). Cependant la réaction d'autoxydation peut être jusqu'à cent fois plus rapide que le transfert d'un électron du domaine réductase, ce qui rend ce dernier cinétiquement incompetent pour cette étape critique du cycle catalytique [74, 76]. Les NOSs doivent donc faire intervenir une source d'électron secondaire, en mesure de réduire le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ plus rapidement qu'il ne s'autoxyde et ainsi assurer le couplage des domaines réductase et oxygénase. C'est le rôle du co-facteur H_4B , qui va transférer un électron au complexe hème ferrique superoxyde et permettre la formation du complexe peroxo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OO}\cdot]$ [73, 78-82], observé par ailleurs lors d'expériences de cryo-réduction avec nNOS [83].

Ce complexe hème-peroxo va ensuite être protoné une première fois pour former un complexe hème-hydroperoxo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}]$. Puis, à l'instar des cytochromes P450, un deuxième proton va entraîner la perte d'une molécule d'eau par rupture hétérolytique de la liaison O-O et former le complexe à haut degré d'oxydation hème-perferryl avec un radical π cation délocalisé sur la protéine (fig. I.12-A, oxoferryl porph π -cation) [84]. Il est important que ces deux étapes de protonation successives soient contrôlées pour éviter la formation de peroxyde d'hydrogène (fig. I.12-A, fuite 2). La poche distale des NOS ne présente pas de résidus donneurs de proton, cependant il semble que le groupe guanidinium de Arg, H_4B ou encore une molécule d'eau, puissent jouer ce rôle et fournir les deux protons nécessaires à cette première étape du cycle catalytique [53, 83, 85-89].

C'est le complexe hème-perferryl qui réalise l'oxydation du substrat Arg en l'intermédiaire NOHA, régénérant la NOS dans sa forme Fe^{III} (fig. I.12-B)[90]. Avant de poursuivre le cycle catalytique, NOS doit également régénérer son co-facteur H_4B . Pour cela, le domaine réductase transfère le deuxième électron du NADPH, jusqu'ici transitoirement stocké par la semi-quinone ($\text{FMNH}\cdot$) [91, 92].

2.3.1.2. Deuxième étape du cycle catalytique : oxydation de NOHA.

Deuxième étape. La seconde étape du cycle catalytique est plus spécifique des NOSs. Elle est présentée figure I.13.

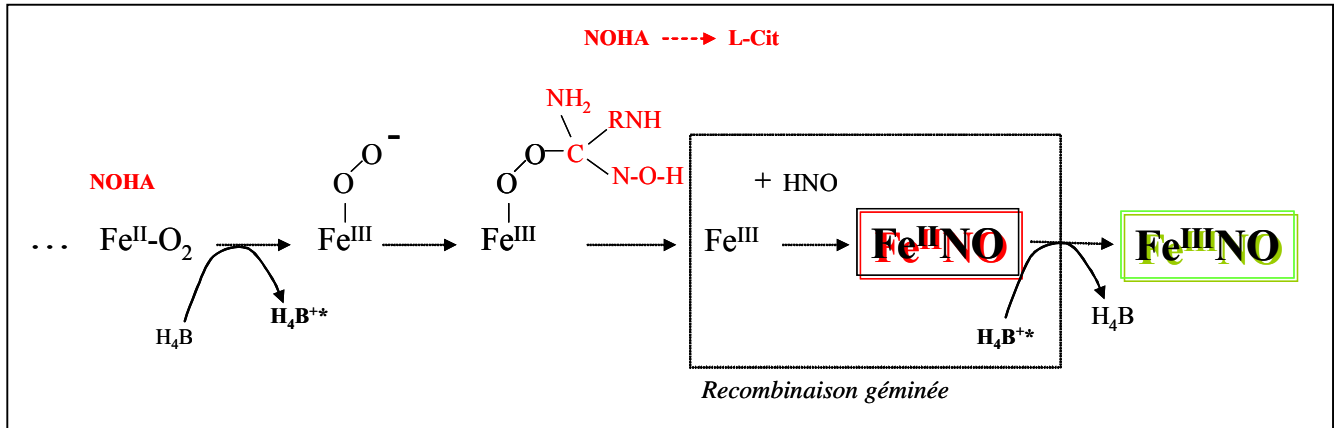


Figure I.13. Deuxième étape du cycle catalytique des NOSs. Oxydation de N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA) pour former le produit L-citrulline (L-Cit) avec libération concomitante d'une molécule de HNO. 0,5 équivalent NADPH est consommé au cours de la réaction par le domaine réductase. La réaction de recombinaison géminée de HNO sur l'hème Fe^{III} permet la régénération du co-facteur H₄B *via* l'oxydation du complexe Fe^{II}-NO. Le produit final du cycle catalytique des NOSs est le complexe Fe^{III}-NO.

Tout se passe de la même manière jusqu'à la formation du complexe hème peroxo [$\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OO}^-$]. Ensuite, la première différence avec l'étape précédente est que ce complexe semble pouvoir réaliser l'oxydation de NOHA en L-citrulline, par attaque nucléophile de la fonction oxime, sans qu'il ne soit nécessaire de passer par un composé perferryl.

Cette réaction mènerait à la formation d'une molécule de L-citrulline et à la libération au site actif d'une molécule de NO^- , ou HNO , mais pas d'une molécule de NO. De plus, à ce stade, le co-facteur H_4B est toujours sous sa forme oxydée et aucun électron n'est disponible pour sa régénération puisque cette étape ne consomme que 0,5 équivalent NADPH [93]. Ainsi il a été proposé un élégant mécanisme de recombinaison géminée du NO^- au fer [94], pour former un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ qui va permettre la réduction du co-facteur H_4B en même temps qu'il est converti en $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$, le complexe final [74, 95].

Suivant l'isoforme considérée et les paramètres cinétiques qui lui sont intrinsèquement associés, le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ va pouvoir : 1) se dissocier et libérer NO ; 2) entrer dans un second cycle réactionnel qui sera détaillé plus loin, mais qui ne produit pas NO (voir 3.) [96, 97].

2.3.2. Régulation de l'activité NO synthase :

L'activité NO synthase est régulée par un grand nombre de mécanismes post-traductionnels [85].

Interactions NOS-protéine. Nous avons précédemment développé l'importance de la fixation de CaM pour le transfert des électrons de $\text{NOS}_{\text{réd}}$ à NOS_{oxy} (voir 2.2.1.). Cependant d'autres protéines participent à la régulation de l'activité des NOSs, par interaction protéine-protéine, comme la protéine de choc thermique Hsp90 (eNOS), la kariline (iNOS) ou la cavéoline (eNOS et nNOS) [98-102].

Phosphorylation. Toutes les NOSs possèdent une petite séquence de 20 à 40 acides aminés en C-terminal, que les réductases de cytochrome P450 n'ont pas [60]. Par phosphorylation de résidus sérine spécifiques, cette queue permettrait la régulation du transfert d'électrons à travers les flavines et ainsi l'augmentation ou la diminution de l'activité réductase [103]. Par exemple, en réponse aux forces de frottement exercées par le flux sanguin, eNOS est phosphorylée par la kinase Akt (Ser1177 eNOS humaine), ce qui a pour effet d'augmenter sa production de NO [104, 105].

Auto-inhibition par NO. En fin de catalyse, si le domaine réductase transfère un électron au fer de l'hème avant que le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ ne se dissocie, il y a formation d'un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ [76, 106-108]. La constante de dissociation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ est faible (1 à

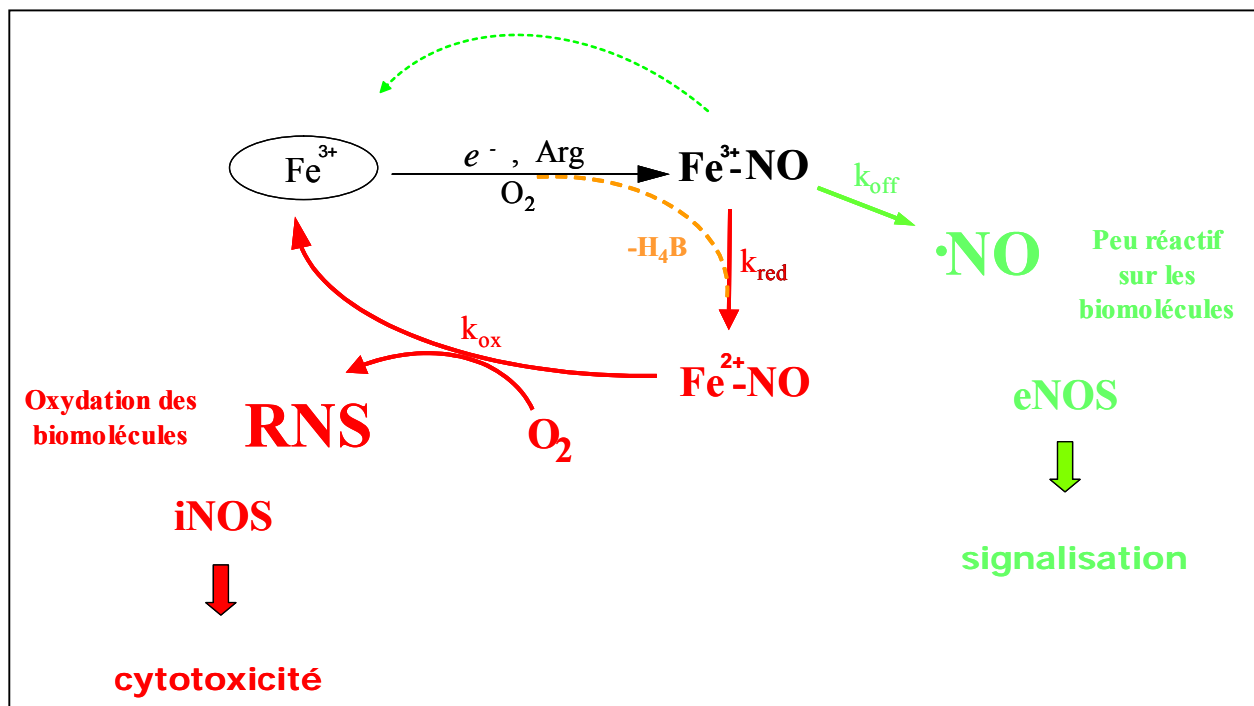


Figure I.14. Partition du cycle catalytique des NOSs. Une voie conduit à la biosynthèse de NO (signalisation, cycle vert), l'autre à la formation de RNSs (cytotoxicité, cycle rouge). Le taux de partition entre les deux cycles est propre à chaque isoforme [96].

$6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pour les NOSs de mammifères). Ainsi sa formation aurait pour effet de bloquer le cycle catalytique de l'enzyme [74, 109, 110]. Chez les mammifères, cette auto-inhibition se manifeste par la présence en phase stationnaire de $\approx 20 \%$ et 80% de complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ pour iNOS et nNOS respectivement [96, 97], tandis que eNOS ne semble pas emprunter ce mode d'inhibition [76].

2.3.3. Les activités NADPH-oxydase et oxydase :

Les NOSs consomment des électrons en oxydant le NADPH du domaine réductase. Elles possèdent donc une activité NADPH-oxydase.

De plus, dans certaines conditions, les NOSs sont capables de produire du superoxyde ou du peroxyde d'hydrogène : 1) par réduction de O_2 par le domaine réductase [111], 2) par décomposition du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ lorsque les concentrations en Arg et/ou H_4B sont insuffisantes (fig. I.12-A, fuites 1 et 2) [112, 113]. C'est l'activité oxydase.

3. Partition du cycle catalytique : une piste pour expliquer la dualité physiologique des différentes NO-synthases.

Toutes les isoformes de NOS suivent le même mécanisme pour la biosynthèse de NO (voir 2.3.1.). Cependant, les conséquences physiologiques de l'activité des NOSs divergent d'une isoforme à l'autre. En effet, si l'activité de l'isoforme endothéliale s'inscrit dans des processus de signalisation (voir 1.1.1.), celle de l'isoforme inductible est impliquée dans des réactions toxiques pour les biomolécules (voir 1.1.3.).

Précédemment il a été évoqué que la source réelle de la cytotoxicité induite par le NO ne soit pas NO mais plutôt les formes réactives de l'azote (RNSs, voir 1.2.) [114, 115]. Cependant, la synthèse de ces RNSs devrait être *a priori* très contrôlée et sa pertinence *in vivo* reste très controversée. Dans ce contexte, la dualité physiologique attribuée au NO persiste mais se reporterait sur les NOSs qui constituent la seule source de production de NO et donc de RNSs chez les mammifères.

Suivant cette idée, une partition finale du cycle catalytique des NOSs a été proposée, et est représentée figure I.14 [96]. Après fixation du substrat Arg, NOS réaliserait les deux étapes catalytiques qui mènent à la synthèse de L-citrulline et du complexe final $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ (voir 2.3.1.2, fig. I.13). A ce stade, et en fonction de l'isoforme considérée, soit la NOS libère NO qui participera à un processus de signalisation (eNOS), soit le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ est réduit

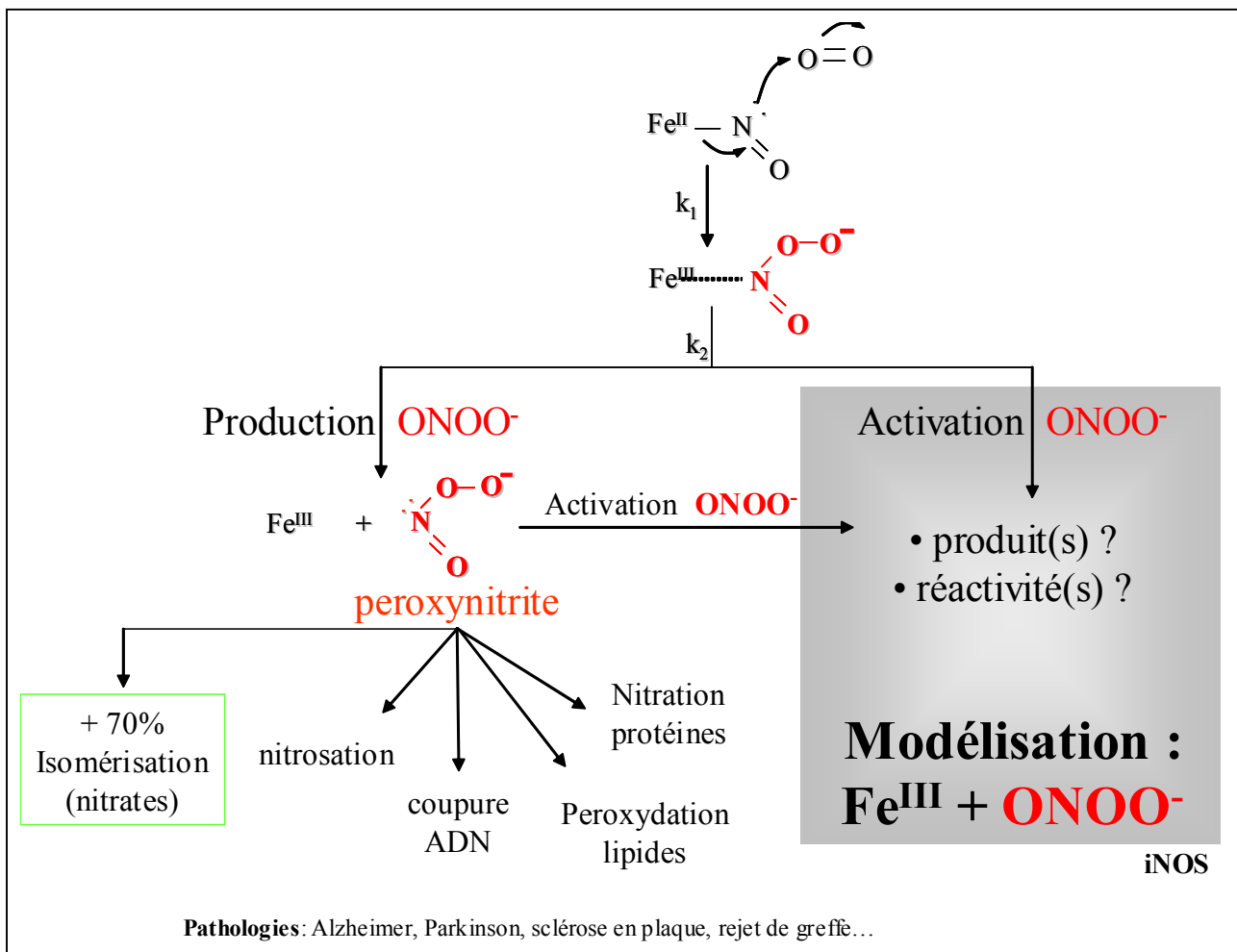


Figure I.15. La réaction dite cytotoxique des NOSs : Fe^{II}-NO + O₂.

pour former l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$. La cinétique de dissociation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ étant très lente, le complexe réagira préférentiellement avec une molécule de dioxygène pour conduire à la formation de RNSs (iNOS). Ainsi dans le cycle catalytique des NOSs, un chemin permettrait une libération efficace de NO (fig. I.14, cycle vert, NO-synthase) tandis qu'un deuxième serait à l'origine de la biosynthèse de RNSs (fig. I.14, cycle rouge, RNS-synthase). La partition du cycle enzymatique en faveur de la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ est différente d'une isoforme à l'autre et dépend des paramètres cinétiques de dissociation (fig. I.14, k_{off}) et de réduction (fig. I.14, k_{red}) du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ [103, 116].

Par ailleurs, en absence du co-facteur H_4B dans la deuxième étape du cycle catalytique des NOSs (fig. I.13), les isoformes découplent leurs activités réductase et oxygénase pour conduire à la libération d'ions superoxyde (voir 2.3.3.). Cependant, si le domaine réductase transfère un électron au complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OO}\cdot]$ avant qu'il ne se dissocie (fig. I.12-A, fuite 1), la réaction d'oxydation de NOHA peut avoir lieu, avec formation concomitante du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$. Ainsi dans ces conditions particulières, qui pourraient correspondre à un état pathologique, toutes les isoformes de NOS sont susceptibles de former le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$.

L'étape catalytique proposée pour la synthèse de RNSs par les NOSs (fig. I.15) part d'un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ qui, après attaque nucléophile sur O_2 , va produire une molécule de peroxynitrite *in situ*, c'est-à-dire au site catalytique. A ce stade plusieurs scénarii sont envisageables : 1) NOS déttoxique PN en catalysant son isomérisation en nitrates ; 2) NOS libère PN qui pourrait alors diffuser vers le milieu extérieur, la toxicité observée *in vivo* étant alors due à la seule réactivité du PN ; 3) NOS active PN pour engendrer la production d'autres RNSs. Dans tous les cas, le stress NO induit par les NOSs serait alors directement corrélé à la réactivité du complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\cdots\text{PN}]$ formé.

4. Objectifs de la thèse :

Notre étude est basée sur la compréhension du cycle dit cytotoxique des NOSs, suivant deux approches distinctes.

Etude de la réaction des NO-synthases avec le peroxynitrite : $\text{Fe}^{\text{III}} + \text{PN}$.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la réaction des NOSs Fe^{III} avec PN, qui semble être un bon modèle pour l'investigation de la réaction rapide du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ avec O_2 [117], et particulièrement pour répondre à la question du devenir du PN une fois

synthétisé au site actif des NOSs (**chapitre III**). Nous avons pour cela combiné des études de cinétiques en mélange rapide avec des études de réactivité du système {NOS + PN} dans le but de comprendre le mécanisme réactionnel et la nature des RNSs produites par la réaction des NOSs avec PN (chapitre III, **1.** et **2.**). Enfin nous avons cherché à comprendre quelles étaient les conséquences d'une production de RNSs sur l'intégrité structurale et fonctionnelle des NOSs, en combinant différentes techniques biochimiques et biophysiques (chapitre III, **3.**). Cette étude a tout d'abord été menée sur l'isoforme inducible des NOSs qui est plus spécifiquement impliquée dans des activités de stress oxydant et est la plus susceptible de libérer des RNSs [103], mais ensuite, pour comparaison, à partir des isoformes neuronale et bactérienne (chapitre III, **4.**).

Nos résultats nous ont permis d'une part de démontrer que, si il y a production de PN au site catalytique des NOSs, il n'en sera pas libéré mais activé, et d'autre part de suggérer une relation directe entre la réaction NOS + PN et la spécificité physiologique de chaque isoforme.

Caractérisation du complexe Fe^{II} -NO.

Ensuite nous avons cherché à comprendre quels paramètres pouvaient gouverner et/ou influencer la production de PN au site actif des NOSs. Pour cela nous avons réalisé une caractérisation du complexe Fe^{II} -NO de iNOSoxy (**chapitre IV**), en utilisant différentes techniques biophysiques, pour avoir accès à la valeur du potentiel redox du couple Fe^{II} -NO/ Fe^{III} -NO (chapitre IV, **1.**) ou encore à des informations relatives à la géométrie du complexe Fe^{II} -NO et à ses propriétés électroniques (chapitre IV, **2.**). Toutes ces études ont été menées dans un premier temps pour iNOSoxy dans différentes conditions d'environnement de l'hème, et dans un second temps pour l'isoforme bactérienne des NOSs, afin de mettre en évidence leurs différences de structure.

L'ensemble des résultats présentés ci-après apporte de nouveaux éléments de compréhension du cycle dit cytotoxique des NOSs et constitue une approche originale pour rendre compte de la spécificité physiologique des différentes isoformes.

Chapitre II.
Partie Expérimentale

Tous les produits chimiques proviennent de chez Sigma-Aldrich, Alexis ou Calbiochem. La plupart des traitements des données sont réalisés avec Origin 6.0 (OriginLab Corp., USA).

1. Obtention, caractérisation spectroscopique et analyses du matériel protéique :

1.1. Surexpression et purification de iNOSoxy :

Le plasmide dont nous disposons nous a été gracieusement donné par D. J. Stuehr. La souche bactérienne *E. coli* BL21 (DE3) possède un vecteur d'expression pcWORI et contient la séquence du domaine oxygénase de iNOS (acides aminés 1-498) auquel un tag de six histidines a été fusionné en position C-terminale. La surexpression de iNOSoxy est placée sous le contrôle du promoteur de la β -galactosidase.

Le protocole de surexpression de iNOSoxy est un protocole standard. L'expression des protéines est induite par l'isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside (IPTG) et la synthèse de l'hème par l'acide δ -amino-lévulénique. Suivent les étapes de lyse bactérienne, de séparation des protéines et de purification de iNOSoxy sur colonne d'affinité (voir annexe 1.). Deux types de préparations de iNOSoxy ont été réalisés suivant ce protocole : en absence de substrat et de co-facteur H_4B (iNOSoxy native), et en présence seule de l'analogue du co-facteur, H_2B , non réactif pour les réactions de transfert d'électron (iNOSoxy + H_2B). Pour cela l'ensemble des solutions à partir de l'étape de lyse bactérienne ont été enrichies de 50 μM H_2B .

Au fil des préparations protéiques, nous avons modifié le protocole de purification ce qui nous a permis d'en améliorer considérablement le rendement et la qualité. Ainsi la fixation des protéines sur la résine de nickel (His-Bind[®], Novagen) et les lavages en absence d'imidazole ont été réalisés dans un bécher 1 L à fond large. Pour ce faire la résine est doucement solubilisée dans un grand volume de tampon *Metal Chelate Affinity Chromatography* (MCAC) ayant servi à re-suspendre les protéines après précipitation au sulfate d'ammonium. L'ensemble est laissé à décanter en chambre froide. Après 1 h 30, la résine sur laquelle est fixée iNOSoxy s'est déposée au fond du bécher et peut être facilement séparée du surnageant. Cette opération est répétée deux fois avant de charger la résine sur la colonne, pour réaliser les cycles de rinçages au tampon MCAC enrichi de 5 puis 60 mM imidazole. L'élution de iNOSoxy se fait à 160 mM imidazole. Notre solution brute de protéines avant purification étant très dense, ce protocole de purification permet un gain de temps considérable. Les étapes

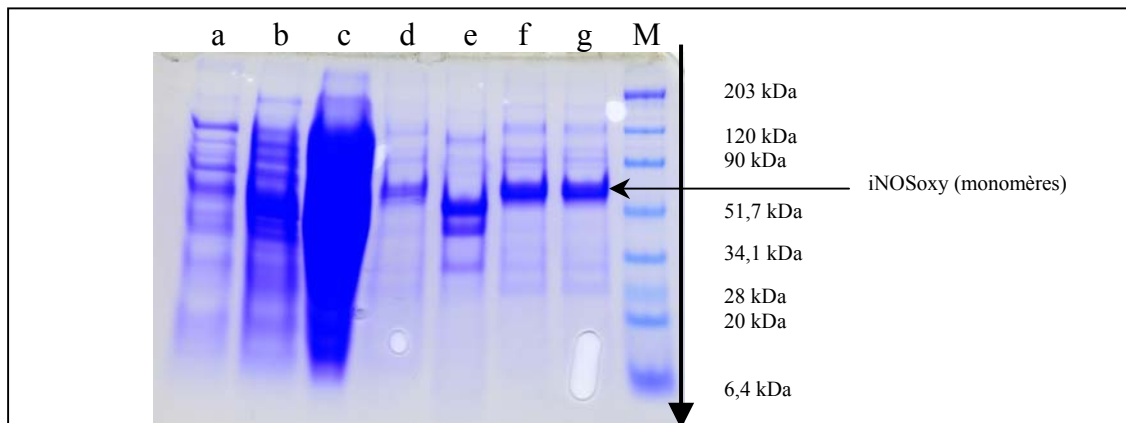


Figure II.1. Gel d'acrylamide obtenu après migration en électrophorèse (SDS-PAGE) d'un aliquot des fractions de tête (puits d), de cœur (f) et de queue (g) collectées après purification de la solution (c) de iNOSoxy, par chromatographie d'affinité. Les puits (b) et (a) correspondent aux solutions récupérées en sortie de colonne lors des rinçages à 5 et 60 mM imidazole respectivement. Le puits (M) contient un mélange de protéines de poids moléculaires connus: myosine (203 kDa), β -galactosidase (120 kDa), albumine de sérum de bovin (90 kDa), ovalbumine (51,7 kDa), anhydrase carbonique (34,1 kDa), inhibiteur de la trypsine du soja (28 kDa), lysozyme (20 kDa) et aprotinine (6,4 kDa). Le puits (e) contient le témoin iNOSoxy-T (= iNOSoxy - les 65 premiers résidus). Une flèche indique le sens de migration en électrophorèse, et la position sur le gel des monomères de iNOSoxy (55-60 kDa) est précisée. La pureté de cette préparation protéique a été estimée à 92 %.

de purification dans le bécher débarrassent de la plupart des impuretés ce qui évite de boucher la colonne. D'autre part, la totalité des sites de fixation de la résine (nickel) sont accessibles à iNOSoxy ce qui peut expliquer l'augmentation du rendement de la purification. Enfin, le réglage d'un flux très lent pour l'étape d'élution (1 goutte toutes les 5 s) permet de concentrer la protéine collectée jusqu'à 250 μ M.

L'étape de dialyse seule ne permettait pas une élimination satisfaisante de l'imidazole. Nous avons significativement amélioré le protocole par réalisation en amont de deux cycles de dilution / concentration des fractions protéiques collectées, en Centriprep[®] Ultracel YM-30 (Millipore Corporation, USA) (dilution avec quatre fois le volume de tampon phosphate 50 mM pH = 7,4 + 250 mM NaCl).

Ce nouveau protocole de purification nous a permis d'obtenir jusqu'à 230 mg iNOSoxy par préparation de protéines, contre un maximum de 80 mg suivant le protocole standard.

1.2. Analyse des protéines :

1.2.1. Migration par électrophorèse des NOSs : SDS-PAGE.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE permet la séparation des protéines, sous l'effet d'un champ électrique, en fonction de leur poids moléculaire. Le gel est composé au 1/5^{ème} supérieur de la zone de concentration des protéines (pH = 6,8) et aux 4/5^{ème} restants de la zone de séparation des protéines (pH = 8,8). Le pourcentage d'acrylamide de chaque zone a été optimisé pour iNOSoxy à 4 % et 8,5 % respectivement. Les protéines (5 μ g final par puits) sont diluées dans un tampon de dénaturation standard (4 % SDS, 10 % glycérol, TRIS 50 mM pH=7,0, quelques cristaux de bleu de Coomassie) enrichi en fonction des conditions de dénaturation souhaitées (en milieu réducteur : +2 % β -mercaptoéthanol; en milieu plus dénaturant : +5 mM EDTA). La dénaturation s'effectue en bain sec à 95 °C pendant 5 à 30 min, suivant le tampon de dénaturation. Un marqueur de migration (BIO-RAD, USA), constitué d'un mélange de protéines de poids moléculaires connus, est introduit dans un des puits du gel. Ainsi nous pouvons apprécier la migration des monomères de NOSs (entre 55 et 60 kDa) et la qualité des étapes successives de purification de nos préparations protéiques (fig. II.1). Les gels peuvent être colorés par incubation 1 h dans une solution de coloration (40 % éthanol absolu; 7 % acide acétique; 0,25 % bleu de Coomassie; H₂O) suivie de rinçages successifs dans la solution de décoloration (40 % éthanol absolu et 7 % d'acide acétique dans H₂O). Pour chaque préparation protéique, une image des gels est enregistrée et conservée afin de témoigner de la pureté du lot, généralement estimée entre 90 et 95 %. Les

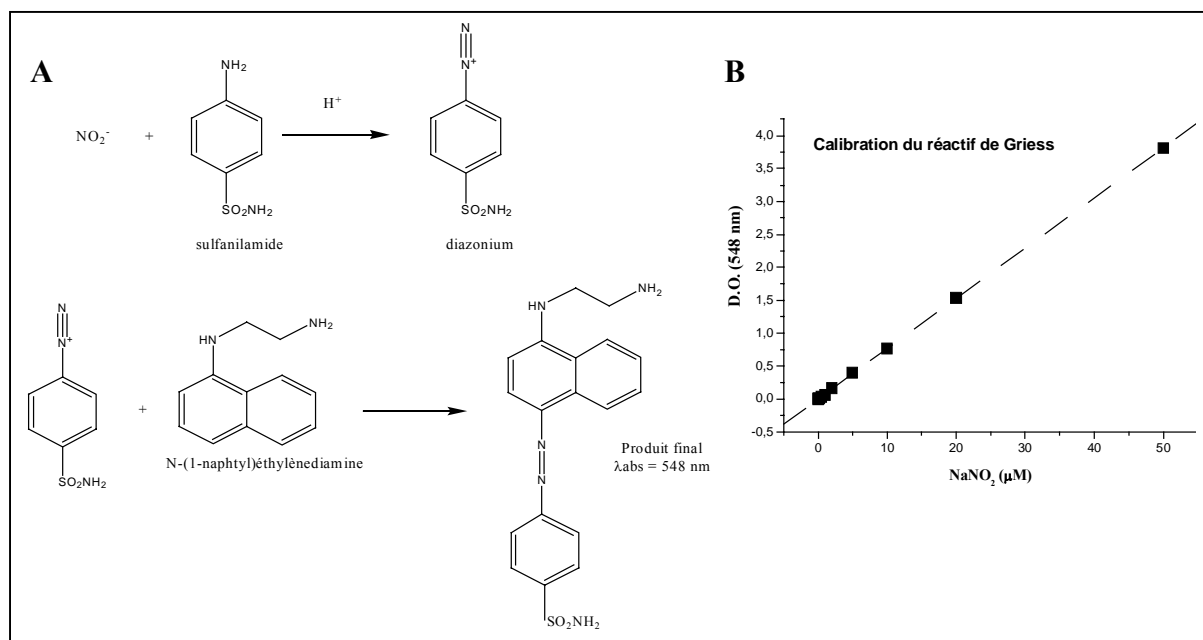
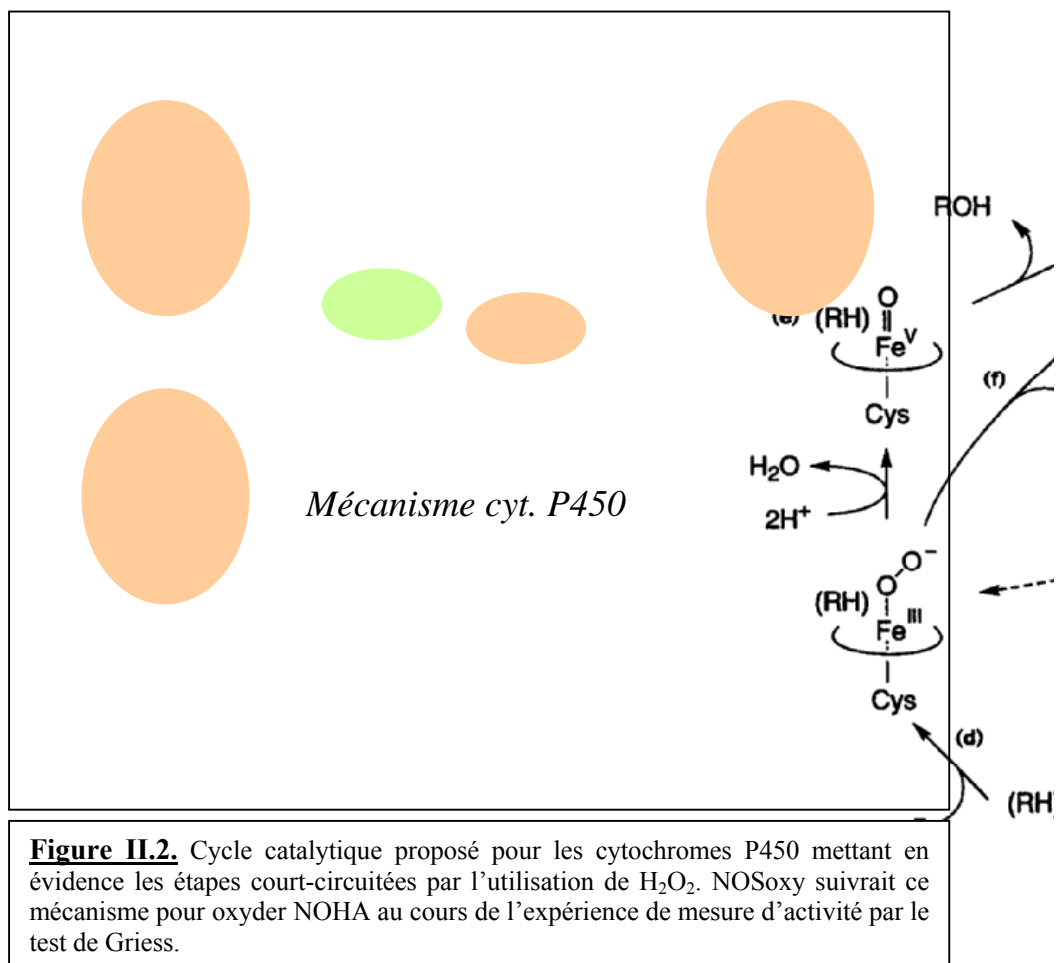


Figure II.3. A. Réaction permettant la détection de la production de nitrites (NO_2^-) grâce au réactif de Griess. Le produit formé absorbe à 548 nm. B. Courbe d'étalonnage du réactif de Griess réalisée par mesure de la densité optique à 548 nm après réaction avec des échantillons de nitrite de sodium commercial en solution ($Y = 0,00157 + 0,07632 X$).

impuretés protéiques résiduelles pourraient être supprimées par réalisation d'une précipitation des protéines suivant un gradient de sulfate d'ammonium.

1.2.2. Mesure d'activité des NOSs : le test de Griess.

L'activité NO-synthase est mesurée par réaction de NOS avec H_2O_2 , en présence de l'intermédiaire réactionnel N^{O} -hydroxy-L-arginine (NOHA). H_2O_2 fournit les électrons et les atomes d'oxygène nécessaires à NOSoxy pour la réaction d'oxydation de NOHA [118]. Le cycle catalytique des NOSs est court-circuité, comme dans le cas des cytochromes P450 (fig. II.2). Le détail de la réaction d'oxydation de NOHA dans ces conditions n'est pas connu. En particulier, NOHA pourrait être oxydé soit par un intermédiaire oxoferryl ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, radical porphyrine ($\Pi^{\cdot+}$)) soit par un intermédiaire peroxy ($\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OO}^{\cdot}$). Cette réaction mène à la formation d'un équivalent citrulline et d'un équivalent NO^{\cdot} . NO^{\cdot} réagirait ensuite de nouveau avec l'enzyme pour former, en condition aérobie, une molécule de nitrite. Le réactif de Griess réagit avec les nitrites formés, et permet donc, indirectement, la mesure du NO produit par les NO-synthases.

L'enzyme (150 nM) est incubée à 30 °C dans le tampon « oxygénase » (KPi 0,1 M pH = 7,4, glycérol 10 %, DTT 1 mM, BSA 0.1 g.L⁻¹, SOD 25 000 U.L⁻¹) en présence de concentrations croissantes du co-facteur H_4B (de 0 à 200 μM). H_4B permet la structuration des monomères de NOS en dimères, alors actifs pour réaliser l'oxydation de NOHA. Après 30 min, la réaction enzymatique est déclenchée par addition de 1 mM NOHA et 30 mM H_2O_2 (200 éq. NOS). Après 10 min d'incubation à 30 °C, la réaction est arrêtée par ajout de 7 mg.L⁻¹ de catalase qui consomme le peroxyde d'hydrogène restant. Chaque échantillon est ensuite dilué par deux dans le réactif de Griess (0,5 g.L⁻¹ naphthyléthylènediamine et 5 g.L⁻¹ sulfanilamide dans HCl 250 mM) qui réagit avec les nitrites suivant la réaction présentée figure II.3. Le produit de cette réaction est détecté par mesure de la densité optique (D. O.) à 548 nm. Un étalonnage du réactif de Griess est réalisé sur une gamme d'échantillons de nitrite de sodium allant de 0 à 50 μM . La production de nitrites par NOS en fonction de la concentration en H_4B est modélisée par une courbe de saturation hyperbolique (fig. II.4). En sont extraites les valeurs de la vitesse maximale de formation de nitrites (V_{max} , nombre de moles de nitrites formés / minute / mole d'enzyme) et de la constante de dissociation apparente pour H_4B (K_d , en μM) (table II.1). Le même protocole est appliqué pour l'analyse des préparations de iNOSoxy réalisées en présence de H_2B , analogue non redox actif du co-facteur H_4B . Les résultats obtenus sont parfaitement comparables à ceux des préparations de iNOSoxy en

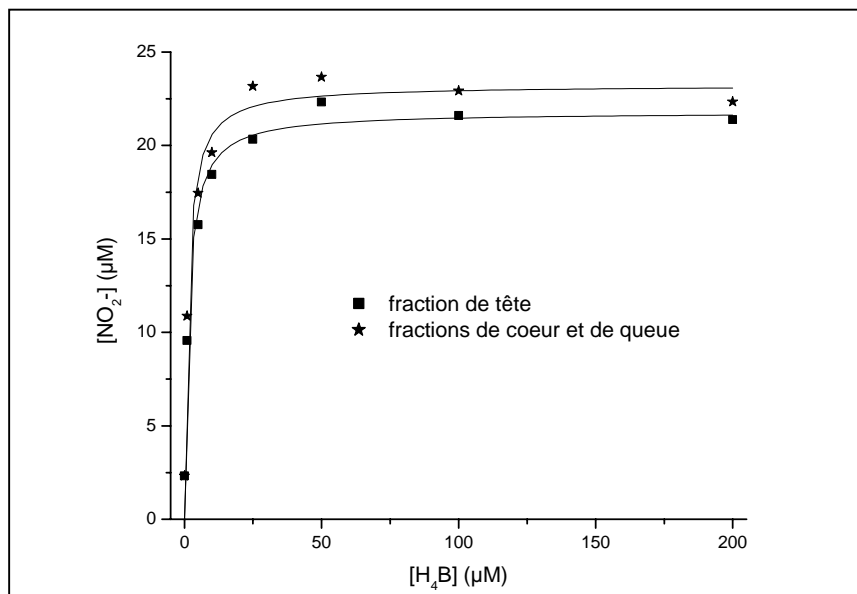


Figure II.4. Courbes de production de nitrites (NO_2^-) représentatives de l'activité des fractions de iNOSoxy obtenues à l'issue d'une préparation de protéines réalisée au laboratoire. iNOSoxy (150 nM) a été incubée en présence de concentrations croissantes de H_4B (de 0 à 200 μM) qui permet la structuration des monomères de iNOSoxy en dimères actifs. Les nitrites sont formés par réaction du substrat NOHA sur iNOSoxy après activation de l'enzyme par H_2O_2 en condition aérobie. La modélisation de ces courbes par une fonction hyperbolique permet de déterminer les paramètres V_{max} et K_d .

Fraction	V_{max} (mol NO_2^- /min/mol iNOSoxy)	K_d H_4B (μM)
Tête	$29,1 \pm 0,9$	$1,5 \pm 0,3$
Cœur + Queue	$31,0 \pm 0,9$	$1,3 \pm 0,3$

Table II.1. Valeurs de la vitesse maximale de formation de nitrites (V_{max} , en nombre de moles de nitrite formées / minute / mole d'enzyme) et de la constante de dissociation apparente du co-facteur H_4B (K_d , en μM) déterminées grâce au test de Griess sur les fractions de iNOSoxy obtenues après purification par chromatographie d'affinité.

absence de substrat et de co-facteur. En particulier l'affinité de H₄B pour iNOSoxy est égale voire supérieure à celle de H₂B. Dans ces conditions la saturation de iNOSoxy en H₄B (K_d) est inchangée qu'il y ait ou non H₂B.

La V_{max} mesurée pour l'ensemble des préparations de iNOSoxy réalisées au laboratoire varie entre 16 et 38 mol NO₂⁻ / min / mol iNOSoxy (moyenne pondérée ≈ 30), avec un K_d apparent pour H₄B compris entre 1,1 et 3,4 μM (moyenne pondérée ≈ 2,1). Ceci est en accord avec les paramètres mesurés pour les préparations de iNOSoxy réalisées au laboratoire de D. J. Stuehr.

Le protocole de surexpression et de purification de iNOSoxy a été réalisé au laboratoire pour la première fois au cours de cette thèse. Le rendement et la qualité des préparations protéiques ont été considérablement améliorés au fil des préparations, essentiellement par modification du protocole de purification. Nous avons ainsi disposé d'un matériel de qualité pour l'ensemble des travaux réalisés.

1.3. Caractérisation spectroscopique des différents complexes de NOS :

1.3.1. Présentation des espèces Fe^{III} de NOS :

Les spectres d'absorption UV-visible ont été enregistrés sur un appareil UvikonXL (SECOMAM, France).

En absence de substrat et de co-facteur, les isoformes inductible et neuronale de NOS sont à l'état Fe^{III} Bas Spin (BS) 6-coordiné, avec une molécule H₂O en sixième ligand. Le spectre d'absorption UV-visible de ce complexe présente une bande de Soret à 420 nm (fig. II.5-A, spectre noir). Dans ces conditions, la structure dimérique de NOS est fragile et la proportion monomères / dimères est difficile à estimer.

Il peut en outre rester une fraction de NOS qui présente, en sixième ligand, une molécule d'imidazole provenant de la purification sur colonne de nickel. Dans ce cas l'absorption de la bande de Soret est déplacée vers le rouge, jusqu'à 428 nm (fig. II.5-B1). Avant chaque expérience, NOS est conditionnée dans le tampon désiré par deux ou trois cycles de dilution / concentration en Ultrafree-0.5, Biomax-30 (Millipore Corporation, USA) (5 000 tr.min⁻¹, 4 °C). Cette étape permet de débarrasser NOS de l'imidazole résiduel et éventuellement de fixer un substrat ou un co-facteur.

En condition saturante de co-facteur H₄B, le spectre d'absorption UV-visible montre un déplacement de la bande de Soret autour de 400 nm et l'apparition à 650 nm de la bande de transfert de charge, (Cys)S→Fe³⁺, caractéristique des espèces Fe^{III} HS (fig. II.5-B2). Par

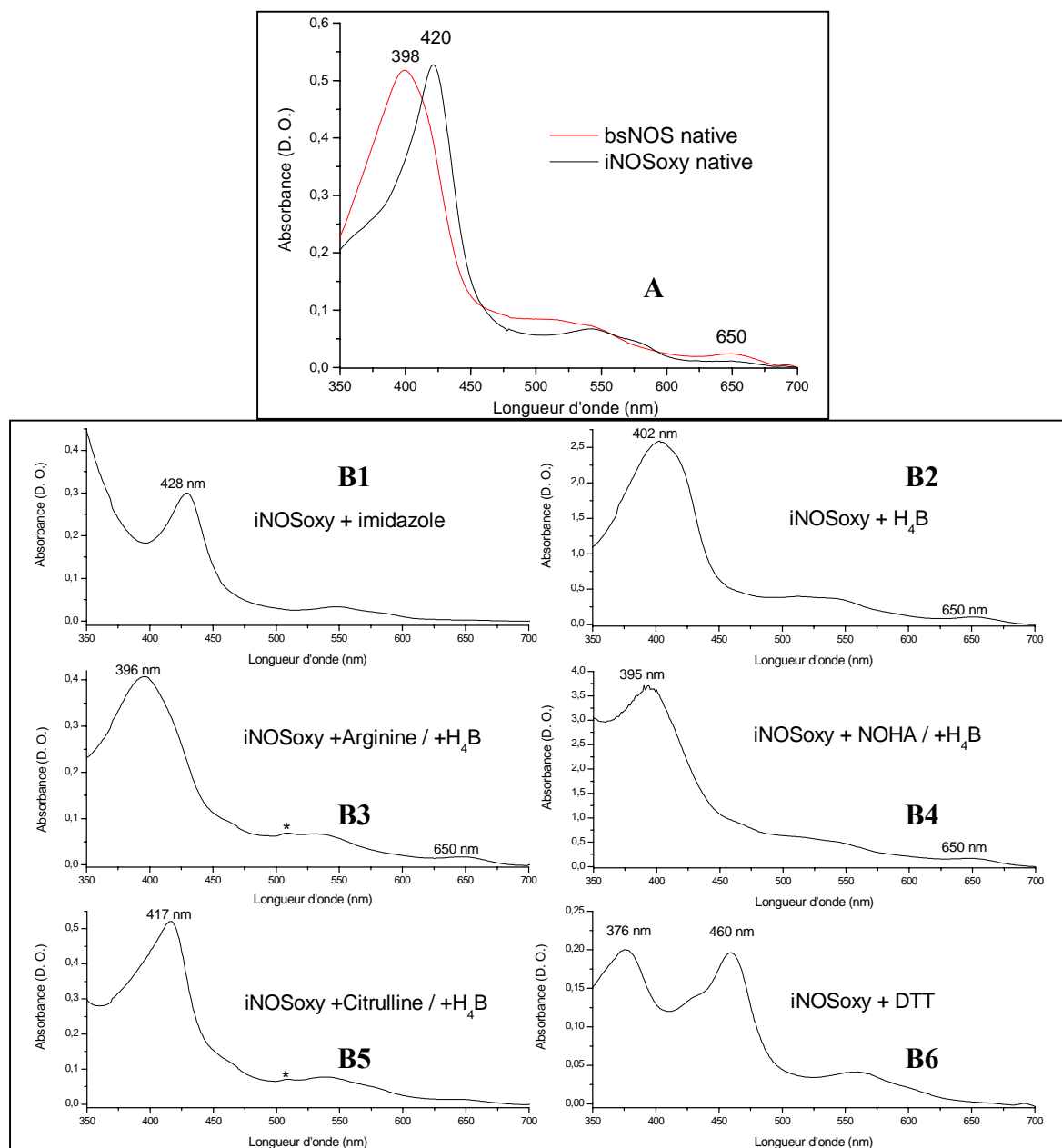


Figure II.5. A. Superposition des spectres d'absorption UV-visible de iNOSoxy (noir) et bsNOS (rouge) en absence de substrat et de co-facteur dans KPi 0,1 M pH 7,4. B. Spectres d'absorption UV-visible des espèces Fe^{III} obtenues après incubation de iNOSoxy avec 1) 3 mM imidazole, 2) 100 μM H_4B , 3) 5 mM Arg et 100 μM H_4B , 4) 5 mM NOHA et 100 μM H_4B , 5) 5 mM Cit et 100 μM H_4B , 6) 3 mM DTT. (*): artéfact dû au spectromètre d'absorption UV-visible.

iNOSoxy	Absorption Soret	Bande de transfert de charge	Etat de spin	Etat de coordination
Native	420 nm	Non	BS	6-coordiné
+ Imidazole	428 nm	Non	BS	6-coordiné
+ H_4B	402 nm	Oui	HS	-
+ Arg / + H_4B	395 nm	Oui	HS	5-coordiné
+ NOHA / + H_4B	395 nm	Oui	HS	5-coordiné
+ Cit / + H_4B	417 nm	Non	BS	-
+ DTT	376 – 460 nm	Non	BS	6-coordiné

Table II.2. Principales caractéristiques du spectre d'absorption UV-visible des différents complexes de Fe^{III} de iNOSoxy. Sont reportées pour chaque complexe: la longueur d'onde du maximum d'absorption de la bande de Soret, l'observation ou non de la bande de transfert de charge à 650 nm, l'état de spin et l'état de coordination du fer de l'hème.

ailleurs, il est possible que la fixation du co-facteur ne chasse que partiellement la molécule d'eau du site actif. H₄B se fixe latéralement à l'hème et entre dans un réseau de liaisons hydrogène avec les propionates et le squelette protéique rendant la structure de la NOS plus rigide. La présence de H₄B induit la dimérisation totale des monomères de NOS. Une fois H₄B fixé, le substrat L-arginine (Arg), ou l'intermédiaire réactionnel NOHA, entre et se positionne facilement dans la poche de l'hème. H₄B forme en outre une liaison hydrogène avec Arg. Dans ces conditions, 100 % des NOSs sont Fe^{III} HS 5-coordiné. Le spectre d'absorption UV-visible est modifié par un déplacement de la bande de Soret de 400 à 395 nm (fig. II.5-B3 et 4).

Quant à la citrulline, produit catalytique des NOSs, elle se fixe à l'hème en présence de H₄B pour former une espèce Fe^{III} BS (fig. II.5-B5).

Sauf contre indication, du dithiothréitol (DTT) est ajouté aux solutions de H₄B pour le protéger de l'oxydation. NOS fixe le DTT pour former une espèce BS 6-coordiné. Le spectre d'absorption UV-visible de ce complexe est caractéristique d'un composé bithiolate avec deux maxima d'absorption à 375 et 460 nm (fig. II.5-B6).

La table II.2 reprend les principales caractéristiques des espèces Fe^{III} de iNOSoxy [119].

En absence de substrat et de co-facteur, le spectre d'absorption UV-visible de bsNOS présente toutes les caractéristiques d'une espèce HS (fig. II.5-A, spectre rouge). La bande de Soret et la bande de transfert de charge sont observées autour de 395 nm et 650 nm respectivement. L'addition de Arg et/ou H₄B ne modifie pas le spectre d'absorption de bsNOS.

1.3.2. Test P450 et détermination de la concentration en NOSoxy :

L'enzyme native, Fe^{III} BS 6-coordiné, est incubée 30 min à 30 °C dans un tampon KPi 0,1 M pH 7,4 contenant 10 mM Arg, 100 µM H₄B et 3 mM DTT. La fixation du substrat et du co-facteur est vérifiée par la position du maximum d'absorption de la bande de Soret à 395 nm (fig. II.6, spectre noir). L'espèce Fe^{II} est formée par ajout d'un excès d'hydrosulfite de sodium solide (Na₂S₂O₄, dithionite) dans la cuve en quartz. L'absorption de la bande de Soret se déplace à 412 nm (fig. II.6, spectre bleu) et la superposition des spectres d'absorption des espèces Fe^{III} et Fe^{II} indique un point isobestique à 480 nm. Le complexe Fe^{II}-CO est formé par ajout de CO gaz directement dans la cuve. Le spectre rouge de la figure II.6 présente le spectre d'absorption enregistré. La concentration d'enzyme fonctionnelle, c'est-à-dire préservant le lien thiolate proximal, est calculée à partir de la valeur de l'absorbance à 444 nm ($\epsilon = 74\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), caractéristique de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ des complexes Fe^{II}-CO des hémothiolates, type cytochrome P450. L'épaule observé à 420 nm correspond à la

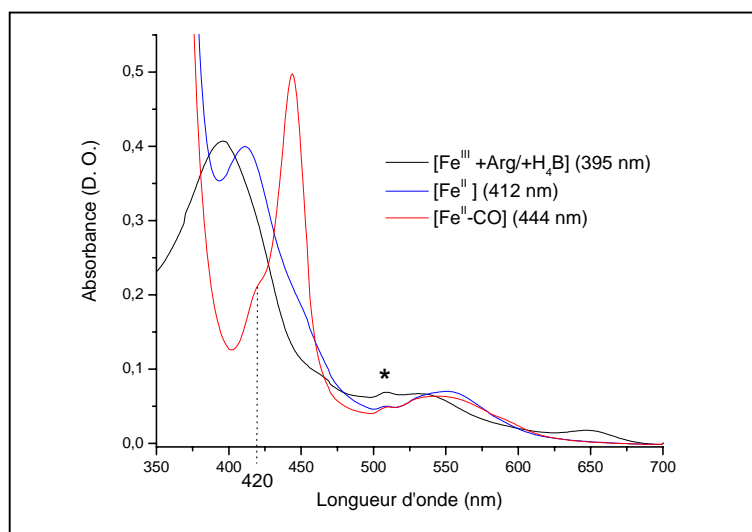


Figure II.6. Superposition des spectres d'absorption UV-visible des espèces iNOSoxy formées dans KPi 0,1 M pH 7,4 a) en présence de Arg et H₄B (noir, Fe^{III}), b) après addition d'un excès de dithionite (bleu, Fe^{II}), c) après addition de CO gaz (rouge, Fe^{II}-CO). L'épaulement observé à 420 nm sur le spectre d'absorption rouge correspond à l'espèce Fe^{II}-CO 5-coordinée, ayant perdu le lien thiolate proximal. (*): artefact de la mesure lié au spectromètre d'absorption.

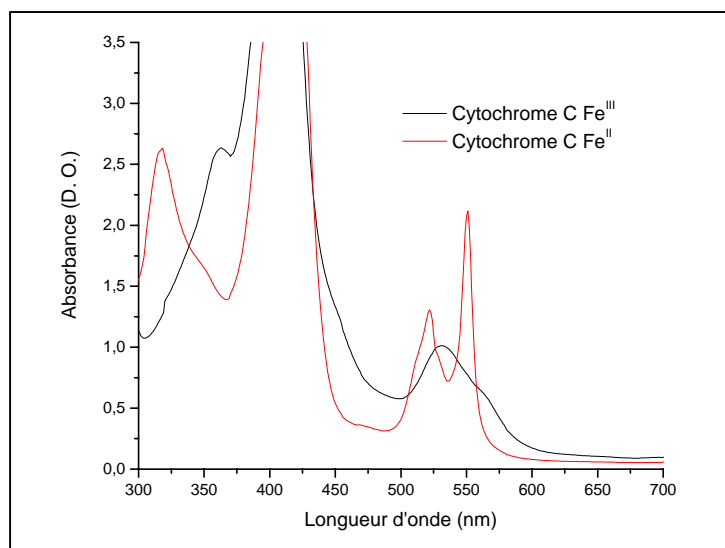


Figure II.7. Superposition des spectres d'absorption UV-visible du cytochrome c avant (Fe^{III}) et après réaction avec le dithionite (Fe^{II}) dans un tampon HEPES 0,1 M pH 7,4.

contribution de l'absorption du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$, 5-coordiné, ayant perdu la cystéine proximale.

En fonction de la qualité de la préparation protéique le rapport des absorptions à 444 et 420 nm varie entre 1,5 et 4. Il semble qu'il soit intrinsèquement lié aux précautions prises lors des différentes étapes de la purification de iNOSoxy, et notamment au maintien permanent des protéines en dessous d'une température de 8 °C.

1.4. Préparation des échantillons $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de NOS :

Toutes les solutions sont préparées à partir d'un tampon HEPES 0,1 M pH 7,4 dégazé à l'argon. Toutes les seringues utilisées sont étanches aux gaz (MicroliterTM, Hamilton, Suisse) et sont dégazées au préalable dans le tampon HEPES 0,1 M pH 7,4.

Le laboratoire est équipé d'un dispositif combinant une rampe à gaz et une rampe à vide montées en parallèle. Dans la rampe à gaz circule de l'argon ou de l'azote. Ce dispositif permet le conditionnement des échantillons en atmosphère inerte par réalisation de plusieurs cycles connectant successivement l'échantillon avec le vide puis avec le gaz.

1.4.1. Préparation d'une solution anaérobie de dithionite et test cytochrome c :

15 mg de dithionite (lot neuf) sont conditionnés en atmosphère inerte dans un pilulier en verre scellé avec un septum. 2 mL de tampon HEPES 0,1 M pH 7,4 dégazés sont introduits dans le pilulier, à l'aide d'une seringue anaérobie, pour solubiliser le dithionite. La concentration théorique d'une telle solution est autour de 40 mM.

La solution de dithionite est dosée par réaction dans une cuve en quartz, avec une solution de cytochrome c commercial à 0,1 mM dans le tampon HEPES 0,1 M pH 7,4. La différence d'absorption du cytochrome c à 550 nm ($\epsilon = 21\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), avant et après réaction avec le dithionite, nous permet de calculer la concentration réelle de la solution de dithionite, généralement comprise entre 20 et 25 mM (fig. II.7).

1.4.2. Préparation d'une solution saturée en NO et test à l'hémoglobine :

2 mL de tampon HEPES 0,1 M pH 7,4 sont dégazés par bullage d'argon dans un flacon en verre hermétique. Cette solution tampon est ensuite saturée en NO par bullage de NO gaz (5 à 10 min), préalablement lavé dans un piège contenant KOH 0,1 N pour éliminer toutes traces de dérivés nitrés. La solution saturée en NO est diluée, à l'aide d'une seringue anaérobie, dans une autre solution de tampon dégazée.

La concentration de NO est déterminée grâce au test à l'hémoglobine. Ce test est basé sur la

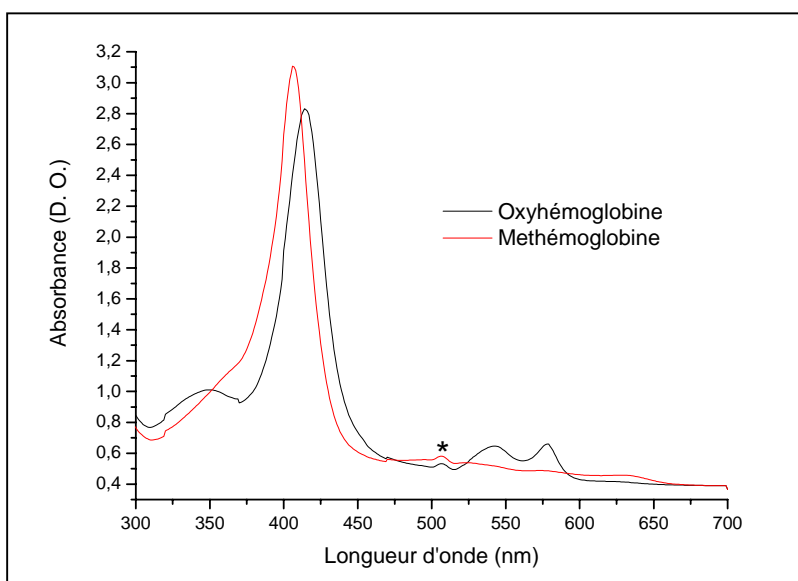


Figure II.8. Superposition des spectres d'absorption UV-visible de l'oxyhémoglobine (HbO₂) et de la méthémoglobine (Fe^{III}) obtenue après réaction avec NO dans un tampon HEPES 0,1 M pH 7,4. (*): artéfact de la mesure lié au spectromètre d'absorption UV-visible.

transformation de l'oxyhémoglobine ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$) en méthémoglobine (Fe^{III}) par réaction avec NO [120].

Une solution stock d'oxyhémoglobine (HbO_2) est préparée à partir de méthémoglobine commerciale. 50 mg de méthémoglobine bovine lyophilisée sont dissous dans 1 mL de tampon KPi 0,1 M pH 7,4 puis réduits par ajout de dithionite de sodium. L'excès de dithionite est éliminé par filtration sur colonne PD-10 SephadexTM G-25M (Amersham Pharmacia Biotech AB, Suède). Cette solution est échantillonnée et conservée à -20 °C.

La solution diluée de NO est dosée, dans une cuve en quartz, par réaction avec une solution d'oxyhémoglobine à 6 mM dans HEPES 0,1 M pH 7,4. La concentration de NO est donnée par la différence d'absorbance calculée entre 577 et 590 nm ($\Delta\epsilon = 10\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) pour les spectres d'oxyhémoglobine enregistrés avant et après réaction avec le NO (fig. II.8). En général, la concentration de la solution saturée de NO est estimée autour de 5 mM. Cette concentration est supérieure à la concentration théorique d'une solution d'eau saturée en NO, donnée à 3,3 mM (1,013 bar et 0 °C).

1.4.3. Formation des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de NOS :

L'enzyme est conditionnée dans un tampon KPi, ou HEPES, 0,1 M pH 7,4 en présence ou non de combinaisons de substrat et co-facteur. La fixation à l'hème du substrat et du co-facteur est systématiquement vérifiée par balayage spectral en absorption UV-visible (maximum d'absorption de la bande de Soret entre 395 et 400 nm).

L'enzyme est ensuite introduite dans une cuve en quartz, ou un tube RPE, fermée par un bouchon en caoutchouc assurant l'étanchéité du système. Trois séries de 20 cycles vide / argon sont réalisées, avec un temps d'attente de 10 min entre chaque série pour laisser se faire l'équilibre des gaz. Hormis pour les expériences réalisées en D_2O et en boîte à gants, l'enzyme est maintenue sur de la glace tout le temps de sa manipulation.

Les conditions les meilleures pour la formation des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ ont été déterminées au cours d'expériences réalisées en boîte à gants. Celle-ci a été équipée d'un spectromètre d'absorption miniature à fibres optiques AvaSpec-2048-SPU (Avantes, Pays Bas), piloté par le logiciel AvaSoft 6.2 (Avantes, Pays Bas), ce qui a permis de suivre l'évolution du spectre d'absorption de NOS au cours des différentes étapes. La figure II.9 présente les spectres d'absorption des espèces observées lors de la construction d'un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ à partir de iNOSoxy + Arg/+H₄B, en boîte à gants.

L'espèce initiale est à l'état Fe^{III} (fig. II.9, spectre noir). NOS est réduite par ajout progressif de la solution de dithionite fraîchement préparée (voir 1.4.1) à l'aide d'une seringue

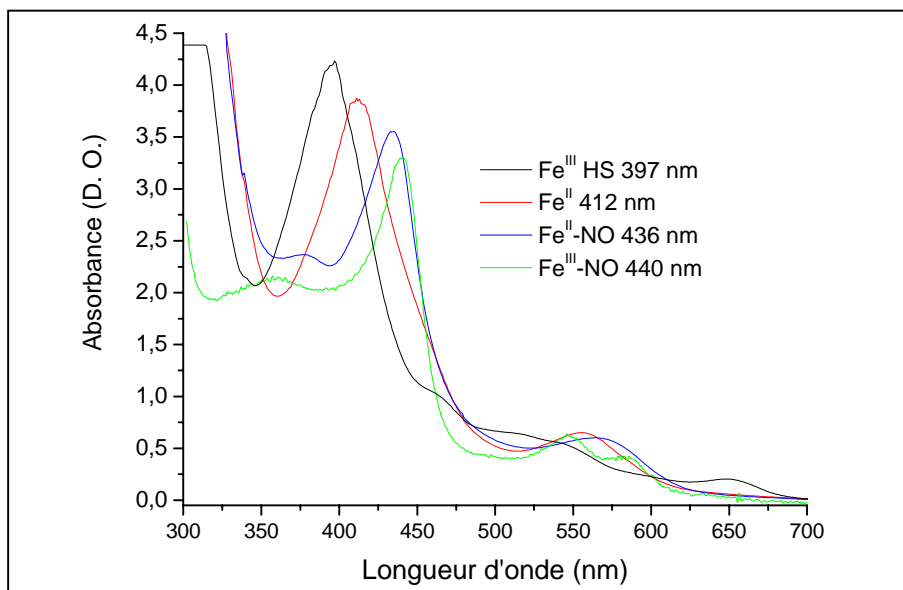


Figure II.9. Superposition des spectres d'absorption enregistrés lors de la construction, en boîte à gants, d'un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$, à partir de iNOSoxy dans un tampon KPi 0,1 M enrichi de 10 mM Arg et 100 μM H_4B . Le spectre initial est celui de l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{ HS} + \text{Arg}/+\text{H}_4\text{B}$ (noir). Après + 2,4 éq. dithionite, le spectre $\text{Fe}^{\text{II}} + \text{Arg}/+\text{H}_4\text{B}$ est enregistré (rouge). Après + 3 éq. NO, le spectre $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ est enregistré (bleu). L'ajout d'un équivalent NO supplémentaire conduit au spectre $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ (vert).

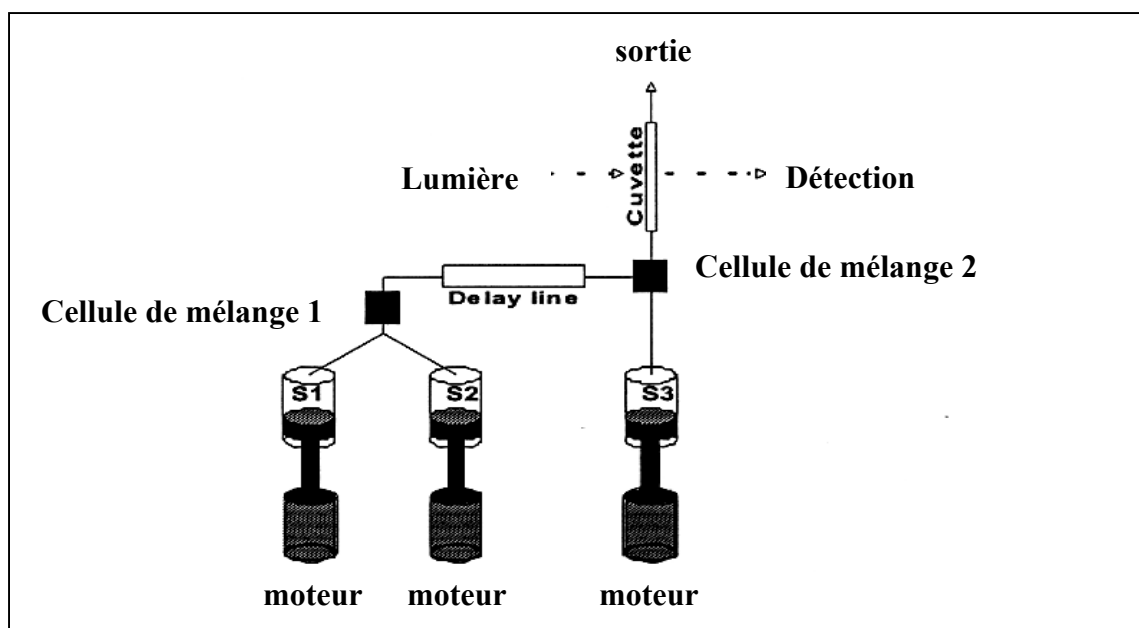


Figure II.10. Schéma des circuits et de la chambre interne du système de mélange rapide. Les échantillons sont introduits dans les réservoirs extérieurs avant de pouvoir être stockés dans les seringues (S1, S2 et S3). Le mélange rapide du contenu de chaque seringue est réalisé après injection des échantillons *via* les pistons motorisés, vers la cellule de lecture (« cuvette »). Une chambre interne supplémentaire (« delay line ») permet de réaliser deux réactions en série.

anaérobie. En absence d'une agitation efficace (typiquement lorsque l'expérience est réalisée dans un tube RPE) 10 min sont nécessaires pour assurer la réduction totale de l'enzyme (fig. II.9, spectre rouge). Avec la même seringue la solution de NO est progressivement ajoutée (voir 1.4.2), un excès local pouvant entraîner la dégradation de la protéine (perte du lien thiolate). NO se fixe sur l'enzyme à l'état Fe^{II} pour former le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$, caractérisé par un maximum d'absorption à 436 nm et une bande d'absorption secondaire à 565 nm (fig. II.9, spectre bleu). Enfin un dernier ajout de dithionite est réalisé afin de débarrasser l'échantillon du NO libre résiduel, et de transformer les espèces $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ (fig. II.9, spectre vert) ou Fe^{III} , potentiellement formées, en $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ et Fe^{II} . En effet, la présence d'espèces Fe^{III} qui n'auraient pas fixé NO contaminerait le signal du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ au cours de l'analyse en spectroscopies Raman et RPE. En absence de contrôle spectroscopique, et notamment pour la préparation des échantillons en tube RPE, les meilleurs échantillons ont été obtenus pour les charges suivantes : 2,4 équivalents de dithionite, suivis de 3 équivalents NO puis 1 équivalent dithionite final.

2. Expériences de cinétiques rapides entre le peroxynitrite et les NOS :

2.1. Description du dispositif de mélange rapide :

Les expériences de cinétiques rapides ont été réalisées sur un Biologic SFM-300 (Bio-Logic Science Instruments SA, France) couplé à un spectromètre à barrette de diode Tidas (World Precision Instruments Inc., USA). L'ensemble du dispositif est piloté par le logiciel Bio-Kine32[®].

Le système de mélange rapide est constitué de trois seringues de 10 mL connectées soit à un réservoir extérieur, soit vers une chambre de mélange elle-même connectée à une cellule de lecture en quartz (« cuvette », fig. II.10). Les seringues S1 et S2 sont reliées à la cellule de mélange 1. La réaction entre les solutions de S1 et S2 peut « vieillir » dans la ligne de retardement (« delay line ») avant d'arriver dans la cellule de mélange 2. Ici le premier mélange rencontre la solution de la seringue S3. Ce dispositif permet de réaliser deux réactions différentes en série. L'utilisation des seringues S1 et S3 s'est avérée suffisante pour l'ensemble de nos expériences.

Avant chaque série de mesure, le système est extensivement rincé avec de l'eau ultra-pure puis avec la solution tampon de l'expérience. Une ligne de base est enregistrée sur cette solution tampon. Elle sera automatiquement soustraite aux spectres enregistrés par la suite

par le logiciel Bio-Kine32. Le système peut être régulé en température par un bain d'éthanol. Généralement, la seringue S1 contient la solution tampon, avec ou sans NOS. La seringue S3 la solution de PN. Les solutions sont préparées en tenant compte du facteur de dilution relatif à la séquence de mélange. Le pH est vérifié après mélange des solutions et aucune variation significative n'a été observée, sauf dans le cas des mesures en conditions stoechiométriques (voir plus loin). Trois mélanges rapides entre les deux solutions sont systématiquement effectués avant la mesure pour nettoyer le système. 750 spectres sont enregistrés pour chaque réaction. Les séquences de temps imposées pour la détection diffèrent d'une expérience à l'autre. Elles sont programmées de manière à couvrir l'ensemble de la cinétique de décomposition du PN, quelles que soient les conditions expérimentales. L'intervalle de temps minimum entre deux spectres est de 3 ms. Le temps mort du système, déterminé par le logiciel Bio-Kine, est estimé à 2 ms.

Pour l'étude de la réaction de NOS avec PN en conditions stoechiométriques, la réaction a été régulée en température à 4 °C. Les volumes mélangés pour la réaction étaient identiques. Le pH de la solution de NOS a dû être ajusté de manière à compenser la solution de NaOH 0,01 N contenant le PN. Ainsi pour des mesures à pH 6,5 – 7,4 – 8,0, les solutions tampon ont été préparées à pH 6,25 – 6,9 – 7,4 respectivement.

L'ensemble des données est enregistré par le logiciel Bio-Kine sous un fichier 3D (longueur d'onde - temps - absorption). Ces données .DAT sont converties en .ASCII par le logiciel Specfit/32 v3.0 37 (Spectrum associates, USA) pour pouvoir être traitées sous Origin 6.0.

2.2. Cinétique de décomposition du peroxyxynitrite :

La cinétique de décomposition du PN est suivie à 302 nm par *stopped-flow* couplé à la spectroscopie d'absorption UV-visible.

Les solutions de peroxyxynitrite 40 mM proviennent de chez Cayman Chemical (USA). Dès réception le stock est échantillonné en 50-100 µL. Le fabricant garantit la stabilité du stock à -80 °C pendant trois mois. Avant chaque utilisation, la solution stock est diluée 200 fois dans NaOH 0,1 N et un spectre est enregistré en spectroscopie d'absorption UV-visible pour déterminer la concentration réelle du lot ($\lambda_{\text{max}} = 302 \text{ nm}$, $\epsilon = 1\,670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Toutes les solutions sont extensivement dégazées pour éviter toute réaction secondaire, principalement entre PN et CO₂, et entre les produits de décomposition du PN et O₂. NOS est incubée en absence de substrat et de co-facteur dans un tampon KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA, ajusté au pH de la réaction. Le DTPA est un chélateur qui permet d'éviter les interactions du PN avec d'éventuels métaux libres en solution. Nous nous plaçons entre 0,1 et

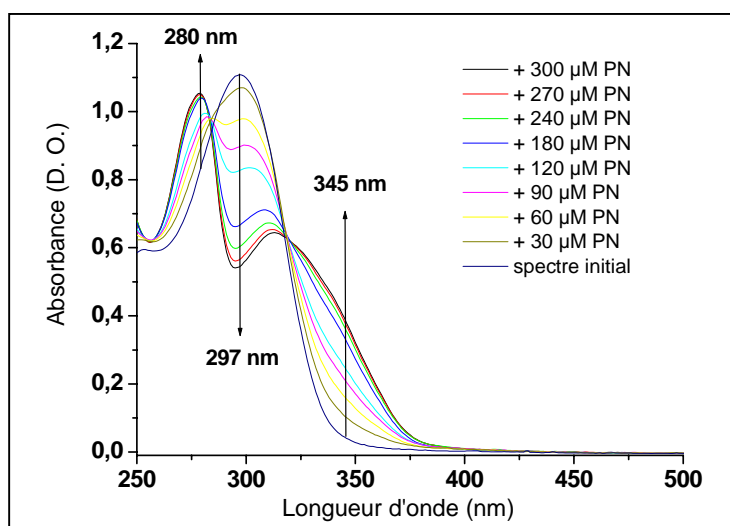


Figure II.11. Suivi par spectroscopie d'absorption UV-visible de la réaction du PN sur H_4B dans une solution de NaOH pH 12. Est mise en évidence la disparition de l'absorption de H_4B (297 nm) au profit de l'apparition de deux nouvelles absorptions à 280 nm et à 345 nm.

1 mM DTPA, gamme de concentrations qui n'affecte pas les cinétiques de décomposition du PN [121]. Au-delà, DTPA réagit avec le PN et accélère sa cinétique de décomposition ($\times 10$ à 2,5 mM DTPA). La solution mère de PN est diluée dans NaOH 0,01 N juste avant la réaction et préparée de manière à faire réagir 100 μ M PN avec la solution contenant NOS.

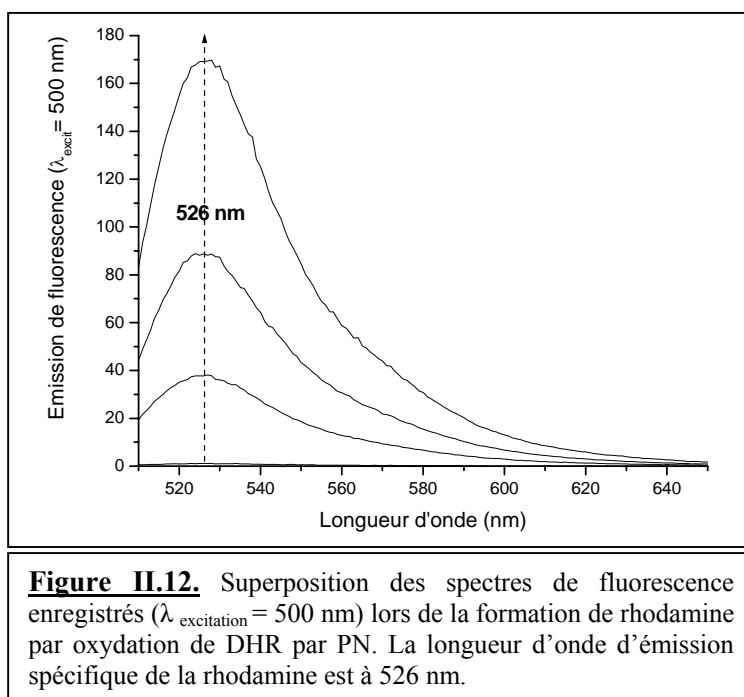
A pH 8,4 les cinétiques de décomposition du PN sont trop lentes pour être suivies par *stopped-flow*. Cette série d'expérience est donc réalisée en spectroscopie d'absorption UV-visible, dans une cuve en quartz 1 mL avec agitation. La solution de PN est ajoutée manuellement à la solution tampon KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA en absence et en présence de NOS. Le temps nécessaire au mélange est estimé à 2 s.

Ces expériences sont réalisées pour des concentrations de NOS allant de 0,5 à 4 μ M. Pour chaque concentration en enzyme, trois cinétiques sont enregistrées. Les paramètres cinétiques des réactions sont déterminés par modélisation mono-exponentielle des cinétiques à 302 nm par le logiciel Origin 6.0. Ce protocole est répété trois fois pour chaque condition expérimentale. Les constantes de vitesse apparentes sont moyennées et tracées sur un graphique en fonction de la concentration en enzyme.

Pour iNOSoxy, les mesures de cinétique rapide sont réalisées à pH 7,4 avec différentes combinaisons d'Arg, citrulline et H₄B, en absence et en présence de 0,1 mM CO₂. Le CO₂ est introduit par ajout de 1 mM bicarbonate de sodium, en solution à 0,5 M dans un Falcon protégé des échanges gazeux avec l'extérieur. Les cinétiques enregistrées en présence de CO₂ ont été modélisées par une fonction bi-exponentielle. Les valeurs obtenues pour la première et la seconde phase de la réaction ont été reportées sur un graphique en fonction de la concentration en iNOSoxy. En présence de H₄B dans le milieu, une phase supplémentaire lente est observée. Elle correspond à une réaction directe entre H₄B libre et PN [122, 123]. Nous avons caractérisé cette interaction (fig II.11). Elle induit effectivement une diminution de l'absorbance à 302 nm. Ceci étant, à pH 7,4, cette phase est trop lente pour interférer sur les paramètres cinétiques de décomposition du PN (à 302 nm), avec et sans NOS.

2.3. Analyse des transitions spectrales sur la protéine :

Les spectres d'absorption, enregistrés dans le temps de la mesure, sont superposés après correction de la ligne de base. Pour ce faire ils sont mis à zéro à 800 nm, longueur d'onde à laquelle NOS n'absorbe pas. Ceci nous permet de mettre en évidence les transitions observées sur le spectre d'absorption de la protéine, ainsi que différents points isobestiques. Le spectre initial de NOS est soustrait à tous les autres et les spectres de différence ainsi obtenus sont superposés. Ceci permet d'observer, par élimination de la contribution du spectre Fe^{III} initial



majoritaire, les variations d'absorption du spectre de NOS, jusqu'aux plus faibles. Les longueurs d'ondes correspondant aux maxima des spectres de différence sont relevées. Les traces cinétiques enregistrées à ces longueurs d'onde sont extraites et reportées ensemble sur un graphique. Ce graphique nous permet de définir dans le temps les phases relatives aux transitions observées sur le spectre de NOS au cours de la réaction avec le PN. En particulier, nous observons que la diminution de l'absorption initiale de la bande de Soret est cinétiquement corrélée à l'augmentation de l'absorption à 445 nm. Nous identifions alors un intermédiaire dont le spectre d'absorption est calculé. Pour ce faire nous soustrayons une fraction X du spectre initial au spectre enregistré au temps t du maximum d'absorption de l'intermédiaire. Cette fraction X varie en fonction des conditions expérimentales (de 0,4 à 0,95).

Nous avons également étudié les cinétiques de formation et de disparition de cet intermédiaire réactionnel, en fonction du pH et de la concentration en PN. Le spectre d'absorption de l'intermédiaire a été calculé pour chaque expérience pour déterminer la longueur d'onde de son maximum d'absorption. Les traces cinétiques sont extraites à cette longueur d'onde. Les cinétiques de formation et de disparition de l'intermédiaire sont traitées séparément et modélisées par des fonctions mono-exponentielles. Les constantes de vitesse obtenues sont représentées en fonction du paramètre étudié (pH, [PN]). Dans le cas de l'étude en fonction du pH, elles sont modélisées par une fonction de titrage. Dans l'étude en fonction de la concentration en PN, elles sont modélisées par une fonction linéaire.

3. Etude de la réactivité du peroxyxynitrite activé par les NOSs et conséquence pour l'enzyme :

3.1. Réactivité du peroxyxynitrite activé par les NOSs :

3.1.1. Réaction d'oxydation à deux électrons :

L'oxydation à deux électrons du marqueur dihydrorhodamine (DHR) par PN conduit à la formation de rhodamine. La rhodamine est caractérisée en spectroscopie de fluorescence par une longueur d'onde d'excitation à 500 nm et une longueur d'onde d'émission à 526 nm (fig. II.12). Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un fluorimètre Cary Eclipse (Varian Inc., USA). La puissance du photomultiplicateur a été fixée à 400 ou 600 V en fonction de l'intensité de fluorescence de l'échantillon.

Dans 100 μ L final de tampon KPi 0,1 M pH=7,4 plus 0,3 mM DTPA fraîchement dégazé à

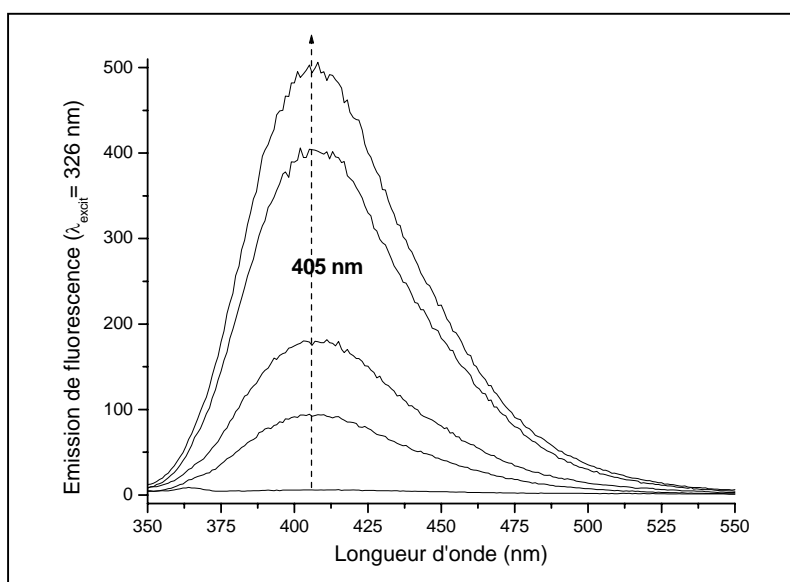


Figure II.13. Superposition des spectres de fluorescence enregistrés ($\lambda_{\text{excitation}} = 326 \text{ nm}$) lors de la formation des dimères de HPA par oxydation à 1 électron de HPA par PN. La longueur d'onde d'émission spécifique de di-HPA est à 405 nm.

l'argon, 40 μM DHR (dans DMF anaérobie), sont mélangés avec des quantités croissantes de PN allant de 10 à 50 μM , en absence et en présence de 20 μM NOS. Après 5 min de réaction, le volume des échantillons est porté à 1 mL pour analyse.

Une série d'échantillons témoins est systématiquement réalisée en parallèle et en même temps. Des échantillons sans NOS permettent de mesurer la réactivité liée au PN seul. Des échantillons « PN décomposé » (pour lesquels le PN, à la concentration voulue, est mis à décomposer au préalable pendant 3 min dans la solution tampon, avant d'ajouter DHR) nous informent sur la réactivité liée aux produits de décomposition du PN. Des échantillons « PN décomposé plus NOS » (ajoutée après décomposition du PN et avant DHR) renseignent sur la réactivité liée à l'éventuelle activation des produits de décomposition du PN par l'enzyme. Des échantillons sans NOS et sans PN donnent la ligne de base de fluorescence.

La même série d'expériences est réalisée en présence de 1 mM CO_2 dans le milieu. Pour cela nous avons ajouté au tampon KPi 0,1 M pH 7,4 fraîchement dégazé, 10 mM bicarbonate de sodium dissous au préalable dans un flacon scellé contenant de l'eau dégazée.

L'intensité de fluorescence de la rhodamine en fonction de la concentration de PN est ensuite modélisée par une droite. La pente de cette droite rend compte de la réactivité du PN pour l'activité d'oxydation à deux électrons. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la réactivité mesurée pour le PN seul, en absence de NOS et de CO_2 .

3.1.2. Réaction d'oxydation à un électron :

Le PN induit la dimérisation du marqueur HPA par réaction d'oxydation à un électron. Le 2,2'-dihydroxybiphényl-5,5'-diacétate formé, ou di-HPA, est analysé par spectroscopie de fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation à 326 nm et une longueur d'onde d'émission à 405 nm (fig. II.13).

Dans 100 μL final de tampon KPi 0,1 M pH=7,4 plus 0,3 mM DTPA fraîchement dégazé à l'argon, 10 mM HPA sont mélangés avec des quantités croissantes de PN (0,5-1-2-4 mM), en absence et en présence de 20 μM NOS. Après 10 min de réaction, le volume des échantillons est porté à 1 mL pour analyse.

Les mêmes échantillons témoins que pour la réaction d'oxydation à deux électrons avec DHR sont systématiquement réalisés, en parallèle et en même temps.

La même série d'expériences est réalisée en présence de 1 mM CO_2 suivant le protocole précédemment décrit pour la réaction avec DHR.

L'intensité de fluorescence des dimères de HPA en fonction de la concentration de PN est ensuite modélisée par une droite. La pente de cette droite rend compte de la réactivité du PN

pour l'activité d'oxydation à un électron. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la réactivité mesurée pour le PN seul, en absence de NOS et de CO₂.

3.1.3. Réaction de nitration :

Les échantillons issus de la réaction d'oxydation à un électron de HPA sont ensuite analysés par chromatographie en phase liquide haute pression (HPLC) afin de détecter la présence éventuelle de nitro-HPA. Les protéines sont éliminées par filtration des solutions (centrifugation en Ultrafree-0.5, Biomax-30, 5 000 tr.min⁻¹, 8 °C). Les échantillons sont conservés à -20 °C. Une mesure en spectroscopie de fluorescence réalisée sur les échantillons juste avant analyse en HPLC montre que les spectres de di-HPA obtenus avant et après congélation sont parfaitement superposables, ce qui *a priori* témoigne de la non altération des solutions. Ces spectres nous permettent également de confirmer que la contribution de NOS dans la mesure de fluorescence est négligeable.

Les analyses HPLC couplées à une détection UV-visible ont été réalisées sur un appareil Dionex équipé d'une pompe modèle P 680 et d'un détecteur UVD 170U (Dionex Corporate). L'ensemble du dispositif est piloté par le logiciel ChromeleonTM 6.40 (Dionex Corporation, USA).

Le dispositif de séparation comprend une colonne SUPERCOSIL LC-8, 15 cm x 4,6 mm, 5 µm (Supelco, USA), précédée d'une pré-colonne Supelguard, Discovery C18, 2 cm x 4,0 mm, 5 µm. Cette dernière protège la colonne de la présence de protéines résiduelles dans les échantillons. La colonne permet une analyse en phase inverse (temps de rétention d'autant plus faible que les produits sont polaires), la phase stationnaire étant composée d'un gel de silice octylsilyl (limite de pression ≈ 125 bar). La phase mobile est constituée des solutions (A), H₂O / CH₃COOH 1 % (pH = 2,8), et (B), CH₃OH / CH₃COOH 1 %. Le flux est constant à 1 mL.min⁻¹, la détection est réalisée à deux longueurs d'onde : 280 et 365 nm. Le volume d'échantillon injecté est de 20 µL. Le gradient de phase mobile est le suivant : 0-5 min : 65 % A / 35 % B ; t = 5 min : injection de l'échantillon ; 5-25 min : gradient linéaire pour obtenir 0 % A / 100 % B ; 25-30 min : stabilisation du gradient ; 30-40 min : gradient linéaire ramenant aux conditions initiales 65 % A / 35 % B ; 40-45 min : régénération de la colonne.

Les temps de rétention (T. R.) des principaux métabolites attendus ont été obtenus par analyse des composés commerciaux suivant notre protocole de séparation. Ainsi HPA sort à 9,2 min (T. R. = 4,2 min) et absorbe à 280 nm. L'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (HO-HPA) sort à 8 min (T. R. = 3 min) à 280 nm. L'acide 4-hydroxy-3-nitrophénylacétique (nitro-HPA) absorbe à 280 et à 365 nm et sort à 11,5 min (T. R. = 6,5 min). Nous ne disposons pas du

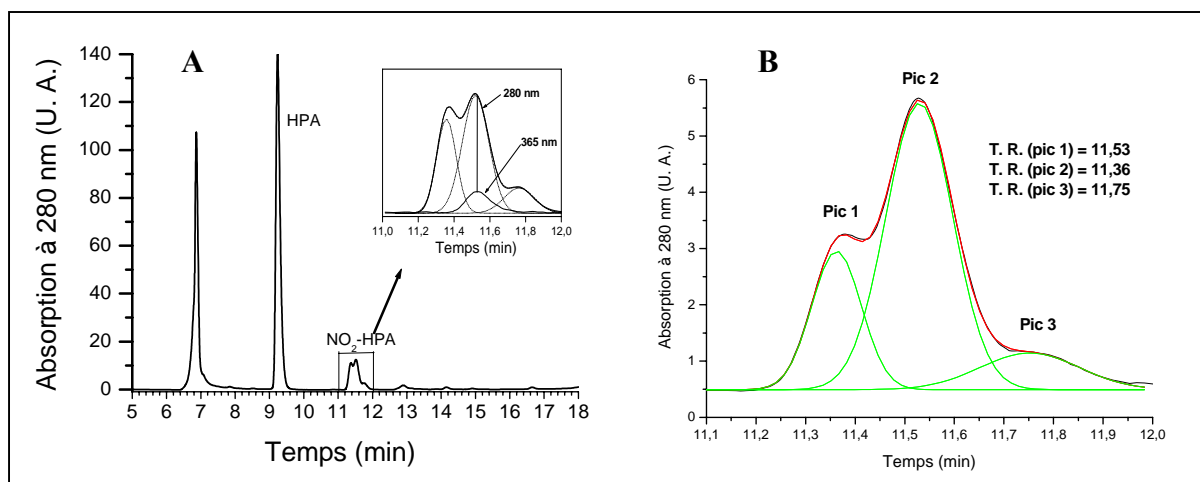


Figure II.14. A. Chromatogramme enregistré à 280 nm au cours de l'analyse en HPLC des produits de réaction de HPA avec le peroxyxynitrite. B. Modélisation du massif de pics observés entre les temps de rétention compris entre 11 et 12 min par une fonction somme de 3 gaussiennes. Le pic 2 correspond au nitro-HPA. Il est observé seul sur les chromatogrammes enregistrés à 365 nm.

dimère de HPA (2,2'-dihydroxybiphényl-5,5'-diacétate) ce qui aurait permis d'établir une corrélation avec les mesures de fluorescences.

L'aire du pic de nitro-HPA (T. R.= 11,5 min) sur les chromatogrammes obtenus à 365 nm est calculée par le logiciel Chromeleon qui corrige automatiquement la dérive de la ligne de base. L'évolution de l'aire de pic de nitro-HPA en fonction de la concentration en PN est ensuite modélisée par une droite. La pente de cette droite rend compte de la réactivité du PN pour l'activité de nitration. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la réactivité mesurée pour le PN seul, en absence de NOS.

Une courbe de calibration de nitro-HPA a été réalisée à partir d'une préparation commerciale (Aire de pic $(\text{UA}_{\text{min}}) = 52,88 \times [\text{HPA}]_{(\text{mM})}$) afin de quantifier la production de nitro-HPA dans nos conditions expérimentales. La formation de nitro-HPA est rapportée à la concentration de PN utilisée pour la réaction (hypothèse de stoechiométrie).

A 280 nm, le pic de nitro-HPA est au centre d'un massif de 3 pics (fig. II.14). Les données sont converties en .ASCII avant d'être modélisées sous Origin par une fonction à deux ou trois gaussiennes. Nous avons ainsi calculé l'aire des pics appelés pic 1 (t = 11,3 min) et pic 3 (t = 11,7 min) et avons modélisé par une droite leur évolution en fonction de la concentration en PN. Les pics 1 et 3 correspondent à des produits de réaction du PN sur HPA qui n'ont pas été identifiés.

3.1.4. Mesure de la teneur en nitrites et nitrates :

3.1.4.1. Principe :

La décomposition du PN en solution aboutit à la formation de nitrates et de nitrites, en proportions variables suivant le mécanisme réactionnel emprunté. A pH physiologique, PN se décompose en 70 % nitrates et 30 % nitrites. L'isomérisation du PN par protonation conduit à 100 % nitrates (pH < 5). A *contrario*, à pH basique, PN se décompose suivant d'autres mécanismes (rupture homolytique de la liaison O-O) pour former majoritairement des nitrites. La mesure du rapport nitrites / nitrates peut donc nous renseigner sur le mécanisme de décomposition du PN.

Nous avons réalisé toute une série d'expériences de décomposition de 100 μM PN seul en solution dans une solution tampon KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA anaérobie à différentes valeurs de pH (4,3 - 6,5 - 7,4 - 8,4). A pH 7,4, un échantillon est réalisé sans DTPA, un autre en conditions non anaérobies, et un dernier avec une concentration de 1 mM PN.

Une deuxième série d'expériences a été réalisée en présence de iNOSoxy. Nous avons analysé

la décomposition de 100 μM PN dans une solution tampon KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA anaérobie à différentes valeurs de pH (6,4 - 7,4 - 8,4), en absence et en présence de 1,5 μM iNOSoxy. A pH 7,4, l'expérience est réitérée en faisant varier la concentration de PN qui se décompose (25 – 50 – 100 – 200 μM PN), en absence et en présence de 1,5 μM iNOSoxy. L'effet de la présence de 1 mM CO_2 a été testé sur la décomposition de 100 μM PN à pH 7,4 en absence et en présence de 1,5 μM iNOSoxy. 6 et 100 μM PN sont mis à décomposer dans la solution à pH 7,4 anaérobie en présence de 6 μM iNOSoxy. Enfin, deux derniers échantillons sont réalisés par décomposition de 100 μM PN dans la solution à pH 7,4 anaérobie avant addition de 1,5 ou 6 μM iNOSoxy. Tous les échantillons sont laissés à incuber 15 min à température ambiante et sous agitation. Pour ceux contenant iNOSoxy, l'enzyme est ensuite éliminée par filtration en Ultrafree-0.5, Biomax-30, 5 000 tr.min⁻¹, 10 °C.

Après décomposition du PN seul ou activation par NOS, les échantillons sont divisés en deux fractions, A et B. La quantité de nitrites en solution est directement obtenue sur la fraction A par réaction avec le réactif de Griess et mesure de la D. O. à 540 nm (voir 1.2.2). Le test à la nitrate réductase est réalisé sur la fraction B. Ce test transforme les nitrates en nitrites ce qui permet, après réaction avec le réactif de Griess, d'accéder à la mesure simultanée de la quantité globale de nitrates et nitrites en solution. La soustraction de la quantité de nitrites mesurée sur la fraction A, nous permet d'obtenir *in fine* la quantité de nitrates de l'échantillon.

3.1.4.2. Test de la nitrate réductase :

La NADPH-nitrate réductase (NR) réduit les nitrates en nitrites en présence de NADPH [124]. En excès, le NADP^+ généré par la réaction peut interférer avec la réaction de coloration au réactif de Griess. Pour éviter ce phénomène, le système glucose-6-phosphate (G6P) / glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-D), qui permet la régénération du NADP^+ en NADPH, est ajouté au protocole [125].

80 U.L⁻¹ NR, 900 μM G6P, 160 U.L⁻¹ G6P-D et 1 μM NADPH sont ajoutés à notre échantillon après dilution dans un tampon KPi 0,1 M pH 7,4. Le NADPH étant très sensible à l'oxydation, les solutions sont préparées fraîches chaque jour. Les échantillons sont ensuite incubés 45 min à température ambiante avec agitation. Le réactif de Griess est alors ajouté par dilution des échantillons (x 2). La D. O. est mesurée, après 15 min de réaction, à 540 nm contre une référence contenant l'ensemble des réactifs dans les conditions de l'expérience.

Parallèlement deux gammes d'échantillons avec des concentrations allant de 0 à 200 μM sont préparées, l'une avec des nitrites, l'autre avec des nitrates. Elles permettront d'une part

d'étalonner le réactif de Griess, et d'autre part de vérifier la transformation des nitrates en nitrites par la NADPH-nitrate réductase (95 % minimum).

Nous avons également réalisé ces mesures en utilisant le kit NitralyzerTM II (World Precision Instruments Inc.). Ce kit permet la transformation des nitrates en nitrites par réaction sur une surface de Cadmium. La détection finale des nitrites en solution se fait par réaction avec le réactif de Griess et mesure de la D. O. à 540 nm.

3.2. Etude des modifications intervenues sur NOS après activation du peroxy-nitrite :

3.2.1. Détection de nitro-tyrosine par immuno-précipitation :

Après séparation par électrophorèse sur gel d'acrylamide (sans coloration), les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène difluorure (Hybond-P, PVDF transfert membrane, Amersham Biosciences). Le transfert s'effectue sur la nuit en chambre froide (4 °C), avec un courant continu de 10 mA, dans un tampon CAPS 10 mM pH 9,8 plus 20 % éthanol. Le lendemain, les membranes sont introduites dans des poches plastifiées contenant du tampon TBS (20 mM TRIS pH = 7,5 ; 150 mM NaCl, 2 % lait écrémé) et maintenues sous agitation pendant 1 h à température ambiante. La caséine du lait assure la saturation des sites de fixation non spécifiques. Après cette étape, le tampon TBS est remplacé par un tampon TTBS (TBS, 0,1 % Tween 20) contenant l'anticorps polyclonal de lapin anti-nitro-tyrosine Calbiochem[®] (dilution 1 / 1 000). Les membranes sont laissées à incuber sous agitation 2 h à température ambiante. Les membranes subissent ensuite quatre lavages successifs avec le tampon TTBS avant d'être incubées 1 h dans du TTBS contenant le deuxième anti-corps (anti-IgG de lapin associé à une alcaline phosphatase, dilution 1 / 10 000). Les membranes subissent alors un dernier cycle de lavage dans le TTBS, puis dans l'eau.

La révélation se fait par colorimétrie, grâce à la présence de l'alcaline phosphatase sur le deuxième anti-corps. Les membranes sont laissées à incuber à l'abri de la lumière dans la solution de révélation (1 mL tampon TRIS 0,1 M pH = 9,5, NaCl 0,1 M et MgCl₂ 5 mM + 10 µL BCIP 25 g.L⁻¹ dans DMSF 100 % + 10 µL NBT 25 g.L⁻¹ dans DMSF 100 %) jusqu'à apparition de bandes colorées. La réaction de révélation est arrêtée en passant les membranes sous l'eau. Les membranes sont alors séchées sur papier absorbant et peuvent être conservées à température ambiante.

3.2.2. Identification des résidus modifiés :

3.2.2.1. Digestion protéique à la trypsine :

Les échantillons de iNOSoxy native et modifiée par PN sont reconditionnés dans du tampon KPi 0,1 M pH 7,4, puis concentrés à 370 μ M en Ultrafree-0.5, Biomax-30. La trypsine est conditionnée à 25 mg.L⁻¹ dans une solution de reconstitution (HCl 1 mM / H₂O, 4°C). La réaction de digestion proprement dite est réalisée sur iNOSoxy à 1 g.L⁻¹ dans du tampon KPi 50 mM plus 10 % acétonitrile, au pH optimal de 8,5, pendant 16 h à 37 °C. Le rapport trypsine / iNOSoxy est de 1 / 100 (p / p). Ces conditions permettent une digestion optimale de iNOSoxy par la trypsine ainsi qu'une bonne détection des fragments peptidiques par la suite en HPLC. Après digestion, la solution de peptides est échantillonnée sur de la glace (8 x 100 μ L) et les échantillons sont conservés à -80°C. Les fragments théoriques obtenus après digestion de iNOSoxy par la trypsine (digestion efficace à 100 %) sont présentés en annexe (2.2.).

3.2.2.2. Chromatographie HPLC de fragments protéiques :

Après digestion à la trypsine de iNOSoxy, ayant ou non activé le PN, les solutions de peptides sont analysées en chromatographie HPLC.

Le dispositif de séparation comprend une pré-colonne Supelguard, Discovery C18, 20 x 4,0 mm, 5 μ m (Supelco) suivie d'une colonne Discovery C18, 150 x 4,6 mm, 5 μ m. Cette colonne permet une analyse en phase inverse (limite de pression \approx 4000 psi soit 275 bar). Par comparaison des chromatogrammes enregistrés (avec et sans réaction avec PN), nous pourrions identifier les temps de rétention des peptides, fragments de iNOSoxy, affectés par l'activation du PN.

La phase mobile est constituée des solutions (A), H₂O, TFA 0,1 % et (B), CH₃CN, TFA 0,1 %. Le flux est constant à 0,6 mL.min⁻¹. La détection est réglée sur 4 longueurs d'onde : 214 nm (spécifique de la liaison peptidique), 275 nm (acides aminés aromatiques), 365 nm (nitrotyrosine), et 400 nm. Le volume d'échantillon injecté est de 20 μ L. Le gradient de phase mobile est le suivant : 0-5 min : 100 % A ; t = 5 min : injection de l'échantillon ; 5-7 min : 100 % A ; 7-30 min : gradient linéaire pour obtenir 42,5 % A / 57,5 % B; 30-40 min : gradient linéaire pour obtenir 0 % A / 100 % B ; 40-50 min : stabilisation du gradient ; 50-65 min : gradient linéaire ramenant aux conditions initiales 100 % A ; 65-68 min : régénération de la colonne.

Les peptides présentant une absorption à 365 nm ont été collectés en sortie de colonne pour

être analysés par spectrométrie de masse. Le TFA permet une meilleure résolution en HPLC mais rend l'ionisation difficile en spectrométrie de masse. Ainsi le TFA a été éliminé en passant les fractions collectées sur des colonnes C18 Sepac (International Sorbent Technology, Royaume-Uni) après les avoir diluées dans de l'eau pour rendre la proportion d'acétonitrile négligeable et permettre la rétention des peptides.

Pour éviter de changer l'acide ou dans l'optique d'un couplage LC-MS, le TFA de la phase mobile a par la suite été remplacé par de l'acide formique 0,05 %. Les profils HPLC obtenus sont moins bien résolus qu'avec le TFA mais restent comparables.

3.2.2.3. Spectrométrie de masse :

Les expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées en collaboration avec le Dr Marcel Delaforge du laboratoire stress oxydant et détoxication du CEA de Saclay, et avec les Dr Joëlle Vinh et Paulo Marcello du service neurobiologie et diversité cellulaire de l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles (ESPCI) à Paris. Le principe des différentes techniques utilisées est présenté en annexe (2.1.).

L'identification de la nitro-leucine-enképhaline en spectrométrie de masse (source ESI, *ElectroSpray Ionisation*, couplée à un détecteur à trappe d'ions) a été réalisée avec le Dr Marcel Delaforge. Après réaction de 1 mM L-enképhaline avec 2 mM PN dans KPi 0,1 M pH 7,4 (non dégazé), l'échantillon est passé sur une colonne C18 Sepac afin de le débarrasser de tout contaminant chimique. Les peptides retenus sur la colonne sont élués par 100 % méthanol. Le méthanol est évaporé sur 1 h par centrifugation sous vide et les peptides sont re-solubilisés dans une solution eau : méthanol (50 : 50). L'ajout d'acide formique s'est avéré nécessaire à la détection des peptides en mode positif. Les signaux correspondant aux masses de la L-enképhaline ($556,6 \text{ g.mol}^{-1}$) et de la L-enképhaline nitrée (601 g.mol^{-1}) sont tous deux détectés.

L'identification des masses des peptides de iNOSoxy modifiée par PN a été réalisée avec le Dr Joëlle Vinh par MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*). Les fractions collectées ont été mélangées dans un rapport (1 : 2) avec une solution de matrice α -cyano (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique), puis déposées sur la plaque d'analyse. Les échantillons les plus dilués ont été évaporés à sec, repris dans 1 μL de matrice, passés sur vortex, puis dans un bain d'ultrasons, et enfin centrifugés avant dépôt. Des échantillons protéiques standards, de masse connue, ont été déposés sur la plaque d'analyse pour permettre un re-calibrage de l'appareil à intervalles réguliers.

Deux banques de données ont été utilisées pour analyser les résultats. La première a été créée

à partir de la séquence de iNOSoxy, la seconde est une banque de données non redondante téléchargée à partir de Uniprot-SwissProt. Les recherches ciblées dans ces banques de données ont été réalisées en imposant divers paramètres tels que la nature de l'enzyme de digestion (trypsine), un maximum de deux coupures manquées et la possible présence de résidus modifiés. Ces derniers ont été définis comme pouvant correspondre à des résidus nitrotyrosine et méthionine oxydée. L'erreur permise pour l'identification d'une masse à un peptide de la banque de données a été fixée $< 0,5$ Da. Par ailleurs les listes complètes de masses détectées ont été systématiquement générées et la recherche d'autres modifications de peptide a été vérifiée manuellement, notamment pour les fragments pouvant comporter des résidus nitrotryptophane.

Des essais de mesure de masse exacte sur protéine entière ont également été effectués par le Dr Paulo Marcello à partir de iNOSoxy native, en utilisant un spectromètre de masse FTICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) muni d'une source nano-spray (ESI). La protéine étant conditionnée en milieu salin (KPi), une étape de dessalage sur micro-colonne C4 (ZipTip[®], Millipore) a été réalisée avant conditionnement de la protéine dans différents solvants (acétonitrile, méthanol) acidifiés par de l'acide acétique ou formique.

4. Mesures biophysiques :

4.1. Spectroscopie Raman de résonance :

La spectroscopie Raman de résonance est d'une grande aide dans l'exploration des sites actifs des métalloprotéines. Particulièrement dans l'étude des hémoprotéines pour lesquelles les transitions électroniques sont déjà bien caractérisées. Le principe de cette technique est détaillé en annexe (3.).

Les spectres sont obtenus avec un spectromètre T 64.000 (Jobin Yvon SPEX) modifié au laboratoire. L'utilisation d'un filtre holographique passe bande (Kaiser Optical Systems) spécifique à la longueur d'onde d'excitation permet d'absorber le plus possible la lumière Rayleigh (incidente). Le détecteur est de type CCD (*Charge Coupled Deviced*) avec 2000 pixels. Il est refroidi par de l'azote liquide. Les fentes sont ouvertes à 100 μm permettant une résolution spectrale $\leq 3 \text{ cm}^{-1}$. Il est relié à un système informatique permettant le pilotage, l'enregistrement et l'accumulation des données par le logiciel Speclab v 3.03 (Jobin Yvon). Le calibrage s'effectue sur la bande de diffusion Rayleigh (à zéro).

Trois sources lasers continues ont été utilisées en fonction de la longueur d'onde excitatrice :

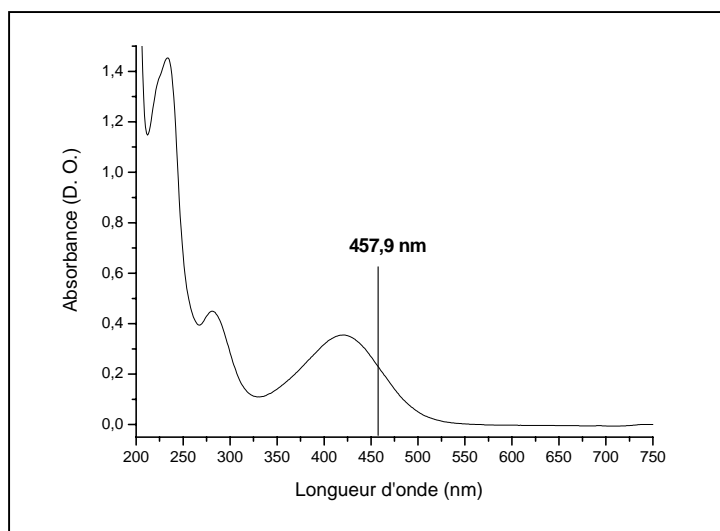


Figure II.15. Spectre d'absorption UV-visible de la nitrotyrosine en solution à 50 μ M dans KPi 0,1 M pH 7,4.

i) un laser à Helium-Cadmium ionisé (Kimmon IK) qui produit un faisceau centré à 441,6 nm, ii) un laser à Krypton ionisé (Spectra-Physics 2000) dont nous avons utilisé les raies produites à 406,7 et 413,1 nm, iii) un laser à Argon ionisé (Coherent Innova 70) qui produit un faisceau centré à 457,9 nm. La puissance des lasers au niveau de l'échantillon est de 20, 5 et 1 mW respectivement.

La longueur d'onde du laser est choisie en fonction du spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon. Elle correspond à une longueur d'onde monochromatique proche du maximum d'absorption UV-visible du chromophore d'intérêt. Pour la caractérisation de l'hème des NOSs nous avons choisi la longueur d'onde d'excitation la plus proche de la bande de Soret : 406,7 nm pour les espèces Haut Spin, 413,1 nm pour les espèces Bas Spin et 441,6 nm pour les espèces $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ et pour l'intermédiaire réactionnel observé en cinétique rapide. L'étude des résidus nitrotyrosine de iNOSoxy a été menée à 457,9 nm. Le spectre d'absorption de la nitrotyrosine libre (fig. II.15) présente une bande large avec un maximum à 420 nm. L'excitation à 457,9 nm permet d'exalter sélectivement ces résidus tout en étant assez loin de la bande de Soret de NOS afin de diminuer la contribution des modes porphyrine.

Pour chaque série d'expérience un titrage de NOS est réalisé pour déterminer la concentration optimale d'étude des échantillons. Elle est fonction de l'espèce étudiée et de la longueur d'onde d'excitation. En condition de résonance de l'hème, les échantillons de NOS sont préparés à 150 μM . En deçà le signal Raman est trop faible, au-delà il est réabsorbé par la protéine. Dans les expériences de détection de résidus nitrotyrosine, la concentration est portée à 1 mM.

Pour des mesures à température ambiante, les échantillons sont préparés dans des tubes RPE tronqués. Le porte échantillon est doté d'un petit moteur permettant la rotation permanente de l'échantillon pendant la mesure. Ceci permet d'éviter la saturation du signal par non relaxation de l'échantillon et également de prévenir la dégradation de l'enzyme, sensible au rayonnement.

Dans le cas des mesures à basse température, nous avons adapté le système pour recevoir un cryostat refroidi à l'hélium. Deux types de cryostat ont été utilisés : i) un cryostat optique STVP-1006 (Janis Research Co. Inc., Wilmington, USA), pour lequel l'échantillon ($V = 10 \mu\text{L}$) est déposé en une goutte sur une lamelle de quartz ; ii) un cryostat ESR900 (Oxford Instruments, Oxon, Angleterre) qui permet la mesure sur des échantillons contenus dans des tubes RPE ($V = 100 \mu\text{L}$).

En dehors des expériences conduites avec le cryostat optique, l'alignement du laser est réalisé dans un premier temps sur un échantillon d'éthanol dont le signal Raman est très intense.

Ensuite la position du faisceau dans l'échantillon protéique est ajustée pour minimiser la réabsorption de la lumière Raman par l'échantillon et optimiser le rapport signal/bruit. La fluorescence de l'échantillon impose le temps d'acquisition d'un spectre, le paramètre limitant étant la saturation du détecteur. Suivant la qualité de l'échantillon (pureté, concentration), la puissance du laser et le degré d'exaltation de l'effet Raman, la qualité du spectre peut varier. En augmentant le nombre d'accumulations le rapport signal/bruit est optimisé. Les spectres contrôles (tampons, PN décomposé), sont systématiquement réalisés dans les mêmes conditions que celles de l'expérience. Les expériences sont reproduites plusieurs fois pour affiner les données et écarter les erreurs pouvant provenir de la préparation protéique.

Le traitement des spectres par GRAMS 32 v 5.2 (Thermo Galactic, USA) permet de corriger d'éventuelles dérives de la ligne de base, de moyenniser des séries de spectres, de supprimer des contributions parasites (rayonnements cosmiques, bruits électroniques). Aucun des spectres présentés durant ce travail n'a été lissé pour en améliorer le rapport signal/bruit.

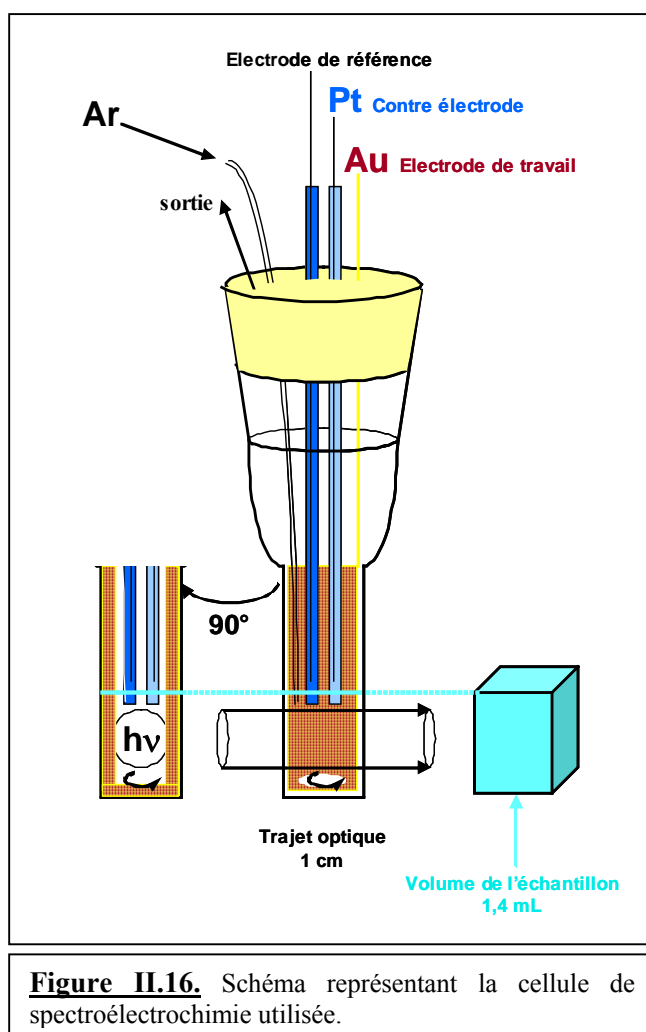
4.2. Spectroscopies RPE classique et à impulsions :

Les expériences de résonance paramagnétique électronique (RPE) classique et à impulsions (ESEEM) ont été réalisées en collaboration avec le Dr Alain Boussac du Laboratoire Bioénergétique moléculaire et Photosynthèse du CEA de Saclay. Les expériences d'ENDOR ont été réalisées au Laboratoire de Chimie Inorganique de l'Université Paris XI, en collaboration avec le Dr Pierre Dorlet qui a récemment rejoint notre équipe.

La spectroscopie RPE classique permet la détection des centres paramagnétiques, c'est-à-dire possédant des électrons non appariés ou un spin non nul. Le principe de cette technique est détaillé en annexe (4.1.). NOS portant un atome de fer, la spectroscopie RPE est particulièrement indiquée pour la détermination de l'état de spin des espèces Fe^{III} qu'elle peut former (HS, $S = 5/2$; BS, $S = 1/2$). Les complexes Fe^{II} -NO sont également étudiés en RPE ($S = 1/2$). Les interactions entre le fer de l'hème et son environnement contribuent au spectre RPE de NOS. Les données RPE sont traitées avec le logiciel WinEPR (Bruker BioSpin, Allemagne) et donnent accès aux valeurs du tenseur g, et aux constantes de couplage des interactions hyperfines.

Tous les spectres de RPE ont été enregistrés à 9,4 GHz sur des spectromètres RPE Bruker Eleksys (500, 580 et 560) équipés d'un système de refroidissement de l'échantillon à l'hélium liquide.

Pour les expériences de RPE, les NOSs (100 μL , 0,1-1 mM) sont toujours conditionnées dans des solutions tampon HEPES 0,1 M pH 7,4, en présence ou non de combinaison de substrats



et co-facteur. Les expériences sont menées à 4 ou 15 K de façon à favoriser l'observation des espèces Haut Spin ou Bas Spin respectivement. La non saturation du signal est systématiquement vérifiée par variation de la puissance.

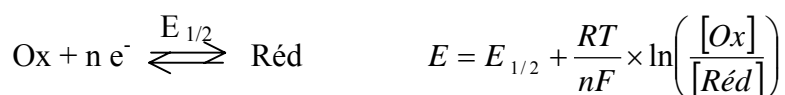
4.3. Spectroélectrochimie :

Les expériences de spectroélectrochimie ont été réalisées en collaboration avec le Dr Véronique Balland du Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire de l'Université Paris VII - Diderot.

4.3.1. Mesure des potentiels redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy :

La cellule spectroélectrochimique a été réalisée sur mesure. Elle est représentée figure II.16. Sa base adopte la forme d'une cuve en quartz standard (trajet optique 1 cm) et sa partie supérieure a été dessinée de façon à ce qu'un bouchon en caoutchouc puisse fermer hermétiquement le système. Le bouchon est percé en son centre pour laisser passer les électrodes, qui plongent dans la cuve, et un capillaire pour le dégazage à l'argon. L'électrode de référence est une microélectrode $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ 3 M (DriRef 2, World Precision Instruments). Son potentiel, déterminé par voltamétrie cyclique, est de 0,208 V *vs* ENH à 20 °C. La stabilité de ce potentiel est régulièrement vérifiée par voltamétrie cyclique. L'électrode de travail est une grille d'or, fixée sur une structure en polyméthylméthacrylate au centre de laquelle est placé un barreau aimanté. La contre électrode est un fil de platine isolé de la solution par un pont salin. La contre électrode est fermée par un bouchon en caoutchouc qui assure l'étanchéité du système, ainsi que le passage d'un capillaire pour un dégazage continu à l'argon. Toutes les électrodes sont connectées au potentiostat.

1350 μL de solution tampon KPi 0,1 M, KCl 0,1 M ajustée au pH désiré et enrichie du médiateur, en présence ou non de 5 mM L-Arginine et 50 μM H_4B ou H_2B , sont mis à dégazer dans la cellule spectroélectrochimique. La cellule est placée dans le spectromètre d'absorption UV-visible, thermostaté à 20 °C, avec agitation. Deux heures sont requises pour rendre la cellule complètement anaérobie, après quoi le capillaire est sorti de la solution pour être placé juste à sa surface. Nous réalisons alors une réduction rapide du médiateur, suivie de sa ré-oxydation, pour s'assurer du bon fonctionnement de la cellule et éliminer des traces d'oxygène résiduelles. Les spectres d'absorption UV-visible du médiateur sont enregistrés toutes les 2 min pendant ces deux étapes ce qui nous permet de vérifier la réversibilité du système et de déterminer les points isobestiques pour les transitions du médiateur dans nos conditions expérimentales. C'est précisément à ces longueurs d'onde, que nous pourrons



Equation II.1. Equation de Nernst pour une réaction d'oxydoréduction échangeant n électrons (e^-) entre la forme oxydée (Ox) et la forme réduite (Réd) d'un couple redox en solution. Soit E (V), le potentiel de la solution; $E_{1/2}$ (V), le potentiel redox du couple Ox/Réd à une valeur de pH donné; R , la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$); T , la température (K) et F , la constante de Faraday ($96\,485 \text{ C.mol}^{-1}$).

iNOSoxy	médiateur	n	équivalents NOS	$E_{1/2}$ médiateur (mV)	pH _{exp}
+Arg/+H ₄ B	phénosafranine	2	5	$-415 < E_{1/2} < -515$	$6,15 < \text{pH} < 9,12$
+Arg/+H ₂ B					
+H ₄ B	phénosafranine	2	1,7	-490 – -502	8,42 – 8,80
	rouge neutre	2	1,3	-541	7,75
	rouge neutre	2	1,3	-532	7,43
	benzylviologène	1	0,03	-567	
	phénosafranine	2	1,2	-428	
	benzylviologène	1	0,17	-567	6,48
	méthylviologène	1	0,07	-657	

Table II.3. Conditions de médiateurs utilisées pour les mesures du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy dans différentes conditions d'environnement de l'hème (Arg, H₄B, H₂B) et à différentes valeurs de pH. Sont indiquées pour chaque condition expérimentale les médiateurs utilisés, le nombre n d'électrons échangés au cours de la réaction redox du médiateur et le potentiel $E_{1/2}$ (mV) du médiateur au pH de l'expérience (pH_{exp}).

suivre les transitions spectrales spécifiques à l'oxydoréduction de la protéine, sans contribution du médiateur. De la même façon, la transition $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de NOS présente un point isobestique à 480 nm, longueur d'onde à laquelle nous suivrons la réaction d'oxydoréduction du médiateur (fig. II.9).

NOS (7 à 30 μM dans 1400 μL final), conditionnée dans le tampon de l'expérience mais en absence de médiateur, est alors introduite dans la cellule à l'aide d'une seringue et le système est laissé à dégazer. Après 1 h, nous commençons l'étude de la vague de réduction en imposant un potentiel de plus en plus réducteur, à raison de -50 mV entre deux points. Toutes les 2 min, le spectre d'absorption UV-visible de la solution est enregistré. Nous considérons que le système a atteint l'équilibre lorsque les spectres d'absorption se superposent parfaitement dans le temps et que la mesure du potentiel libre de la solution correspond au potentiel imposé. En général l'équilibre est atteint au bout de 15 à 25 min. Les valeurs d'absorbance propres à NOS et au médiateur sont relevées à l'équilibre, pour chaque valeur de potentiel. Elles sont systématiquement corrigées par soustraction de l'absorbance mesurée à 820 nm. Ces valeurs sont ensuite exprimées en fraction d'enzyme et de médiateur oxydée et reportées sur un graphique en fonction du potentiel. Les résultats sont modélisés à partir de l'équation :

$$y = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{(E_{1/2} - x) \times nF}{RT}\right)} \quad (\text{avec } y = \frac{[Ox]}{C_{\text{totale}}}, \text{ la fraction oxydée}),$$

dérivée de l'équation de Nernst (éq. II.1). Elle nous permet d'obtenir une valeur de potentiel $E_{1/2, \text{réd}}$ pour NOS et pour le médiateur, ainsi que de vérifier le nombre n d'électrons échangés au cours de la réaction. La réduction est terminée quand le spectre d'absorption n'évolue plus sous l'effet du changement du potentiel imposé dans la solution. Nous commençons alors l'étude de la vague d'oxydation en effectuant des sauts de potentiel plus petits, jusqu'à +20 mV autour du $E_{1/2}$, afin d'obtenir des valeurs plus précises. Suivant la même démarche que pour l'étude en réduction, nous déterminons $E_{1/2, \text{ox}}$ pour NOS et pour le médiateur. De manière générale, $E_{1/2, \text{réd}}$ est légèrement plus bas que $E_{1/2, \text{ox}}$. Ceci peut s'expliquer par la présence de traces d'oxygène dans le dispositif, consommées au cours de la réduction, ce qui la rend plus difficile à amorcer. Nous validons l'expérience si et seulement si les valeurs de $E_{1/2, \text{réd}}$ et $E_{1/2, \text{ox}}$ sont séparées de moins de 10 mV.

La dégradation de la protéine au cours de l'expérience, ne permet pas de réaliser plusieurs titrages dans une même journée. En effet, la diffusion due à la précipitation de la protéine en

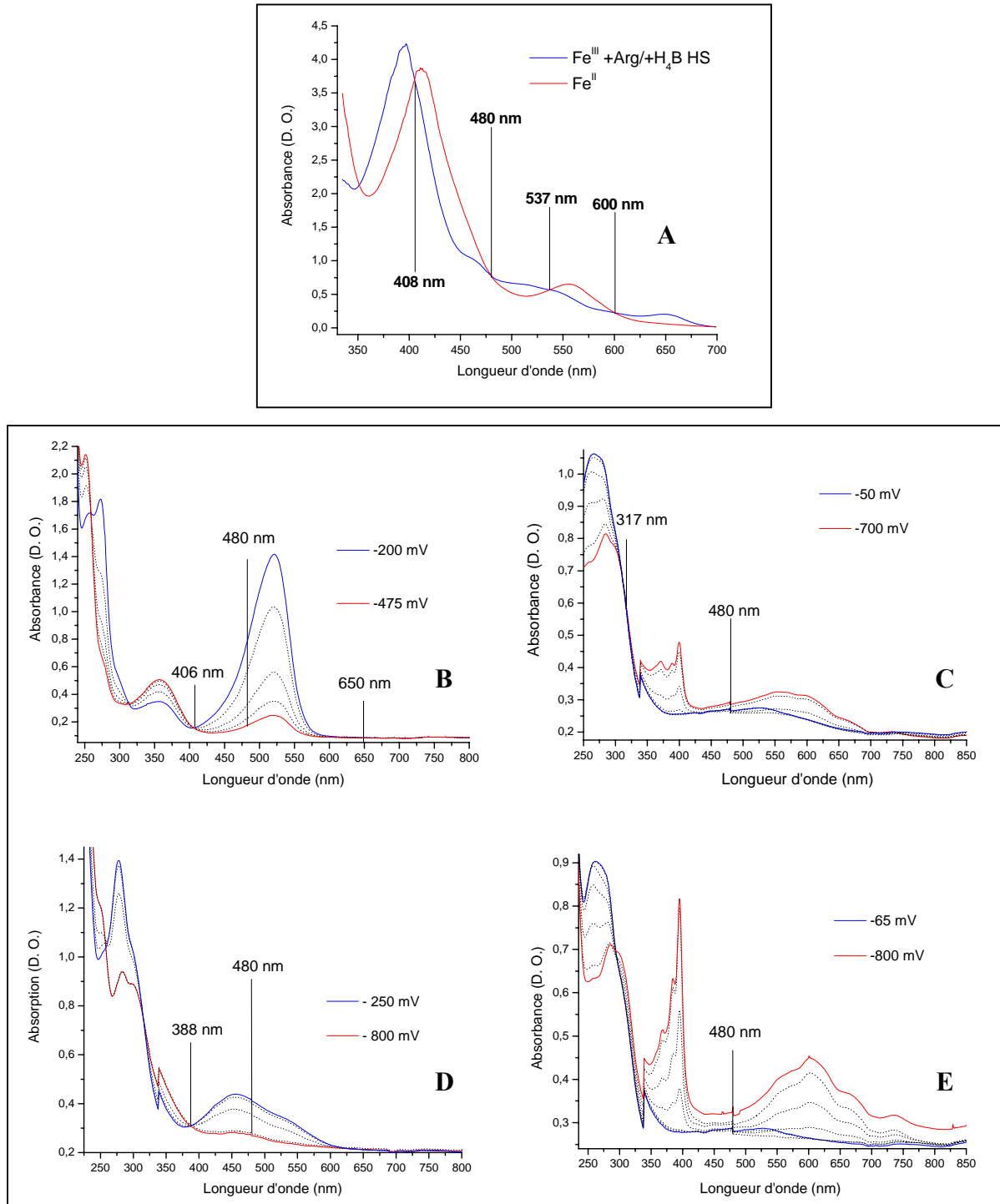


Figure II.17. Spectres d'absorption obtenus au cours de la réduction de **A**) iNOSoxy + Arg/+H₄B par le dithionite, **B**) de la phénosafranine (35 μM) à pH 7,4, **C**) du benzylviologène (20 μM) en présence de H₄B à pH 6,48, **D**) du rouge neutre (30 μM) à pH 7,75 et **E**) du méthylviologène (20 μM) en présence de H₄B à pH 6,48. Le spectre d'absorption correspondant à la forme réduite de chaque espèce est bleu, celui correspondant à la forme oxydée est rouge. Mise en évidence des longueurs d'onde d'observation de la réaction électrochimique. Les variations d'absorption propres au médiateur seront relevées aux points isobestiques observés au cours du titrage redox de l'enzyme (A). Les variations d'absorption propres à l'enzyme seront relevées aux points isobestiques et/ou aux points d'absorption nulle observés au cours du titrage redox du médiateur.

solution perturbe les valeurs des absorbances, particulièrement dans la zone UV du spectre d'absorption.

L'intégralité de ce protocole est répétée pour chaque condition expérimentale. Les médiateurs utilisés (phénosafranine, rouge neutre, benzylviologène et méthylviologène) sont décrits table II.3. La figure II.17 présente l'évolution des spectres d'absorption des différents médiateurs, au cours de leur réduction (forme oxydée, spectre bleu ; forme réduite, spectre rouge).

Différentes expériences ont été réalisées en présence de NO. Pour cela, le système de dégazage continu de la cellule de spectroélectrochimie a été retiré. La cellule et la solution de médiateur qu'elle contient sont dégazées par bullage d'argon. Une fois la cellule parfaitement anaérobie, une étude en oxydation du médiateur est réalisée pour permettre la détermination de son potentiel et l'enregistrement des spectres d'absorption des espèces réduite et oxydée en absence de NO. Ensuite, l'atmosphère de la cellule est substituée par du NO gaz, en légère surpression. Une étude rapide du médiateur en réduction puis plus lente en oxydation sont alors effectuées. Les médiateurs insensibles au NO (spectres d'absorption des formes réduite et oxydée, et valeur du potentiel d'oxydoréduction identiques en absence et en présence de NO) ont ensuite été testés pour la réaction d'oxydoréduction du couple Fe^{II} -NO/ Fe^{III} -NO de iNOSoxy + Arg/+H₄B, suivant le même protocole.

4.3.2. Exploitation des résultats :

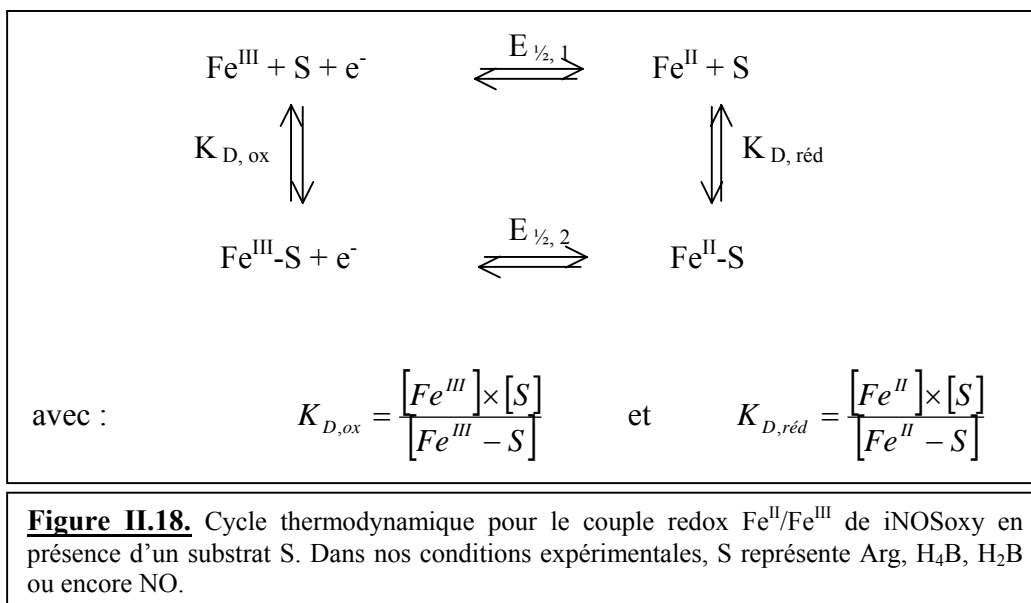
La mesure des potentiels redox du couple Fe^{II}/Fe^{III} de iNOSoxy dans différentes conditions de substrat permet d'accéder aux constantes de dissociation apparentes de ce substrat pour les formes oxydée Fe^{III} ($K_{D, ox}$) et réduite Fe^{II} ($K_{D, red}$) de l'hème.

La figure II.18 présente le cycle thermodynamique pour le couple redox Fe^{II}/Fe^{III} en présence d'un substrat S. Dans nos conditions expérimentales, S représente Arg, H₄B, H₂B ou encore NO. A l'équilibre thermodynamique, l'équation de Nernst s'écrit :

$$E_{\frac{1}{2}, 1} + \frac{RT}{nF} \times \ln\left(\frac{[Fe^{III}]}{[Fe^{II}]}\right) = E_{\frac{1}{2}, 2} + \frac{RT}{nF} \times \ln\left(\frac{[Fe^{III} - S]}{[Fe^{II} - S]}\right) = E$$

$$\text{d'où} \quad E_{\frac{1}{2}, 2} - E_{\frac{1}{2}, 1} = \frac{RT}{nF} \times \ln\left(\frac{[Fe^{III}]}{[Fe^{II}]}\right) - \frac{RT}{nF} \times \ln\left(\frac{[Fe^{III} - S]}{[Fe^{II} - S]}\right).$$

En faisant apparaître les constantes de dissociation du substrat S, cette équation devient :



$$E_{\frac{1}{2},2} - E_{\frac{1}{2},1} = \frac{RT}{nF} \times \ln \left(\frac{[Fe^{III}]}{[Fe^{II}]} \times \frac{[Fe^{II} - S]}{[Fe^{III} - S]} \right) = \frac{RT}{nF} \times \ln \left(\frac{K_{D,ox}}{K_{D,red}} \right)$$

$$E_{\frac{1}{2},2} - E_{\frac{1}{2},1} = \frac{2,303 \times RT}{nF} \times \log \left(\frac{K_{D,ox}}{K_{D,red}} \right)$$

et finalement,

$$\frac{K_{D,ox}}{K_{D,red}} = 10^{\left((E_{\frac{1}{2},2} - E_{\frac{1}{2},1}) \times \frac{nF}{2,303 \times RT} \right)}$$

avec n, le nombre d'électrons échangés au cours de la réaction d'oxydoréduction (n = 1); F, la constante de Faraday (96 485 C.mol⁻¹); R, la constante des gaz parfaits (8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹); et T, la température à laquelle est menée l'expérience (T = 293 K). E_{1/2,1} et E_{1/2,2} correspondent aux potentiels redox du couple Fe^{II}/Fe^{III} mesurés, à un pH donné, pour iNOSoxy ayant fixé ou non le substrat, respectivement.

Chapitre III.

Etude de la réaction des NO-synthases avec le peroxynitrite : Fe^{III} + PN

Articles associés :

1. Maréchal A., Mattioli T. A., Stuehr D. J., Santolini J. (2007) *Activation of Peroxynitrite by Inducible Nitric-Oxide Synthase; a direct source of nitrative stress.* **J. Biol. Chem.** 282, 14101-14112.
2. Maréchal A., Sjödin M., Mattioli T. A., Stuehr D. J., Santolini J. (2007) *Mechanism of NOS-induced Peroxynitrite Activation.* Soumis à **J. Biol. Chem.**

1. Activation du peroxynitrite par l'isoforme inductible des NO-synthases :

La première étape de la réaction dite cytotoxique des NOSs ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} + \text{O}_2$) est l'attaque nucléophile du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ sur une molécule de dioxygène, ce qui conduirait à la formation *in situ* d'une molécule de peroxynitrite (PN, ONOO^-).

Deux scénarii sont envisageables : 1) NOS libère PN et devient une PN-synthase, la toxicité observée *in vivo* étant alors due à la réactivité du PN ; 2) NOS fixe et active PN, ce qui pourrait probablement changer sa réactivité pour soit le détoxiquer, soit le rendre plus toxique. Pour répondre à cette question du devenir du PN une fois synthétisé au site actif des NOSs, nous avons étudié la réaction ($\text{NOS} + \text{PN}$) à partir de l'isoforme inductible des NOSs, puisqu'elle est la plus à même de passer par cette réaction.

Dans un premier temps, nous proposons une présentation du PN et de ses propriétés réactionnelles afin de se familiariser avec la complexité de ce composé chimique.

Ensuite, nous présenterons une étude des cinétiques de décomposition du PN en absence et en présence de iNOSoxy mettant en évidence son activation par l'enzyme, puis une analyse de la réactivité du système $\{\text{NOS} + \text{PN}\}$ que nous comparerons à celle du PN seul pour caractériser d'éventuelles modifications de la réactivité du PN par l'enzyme.

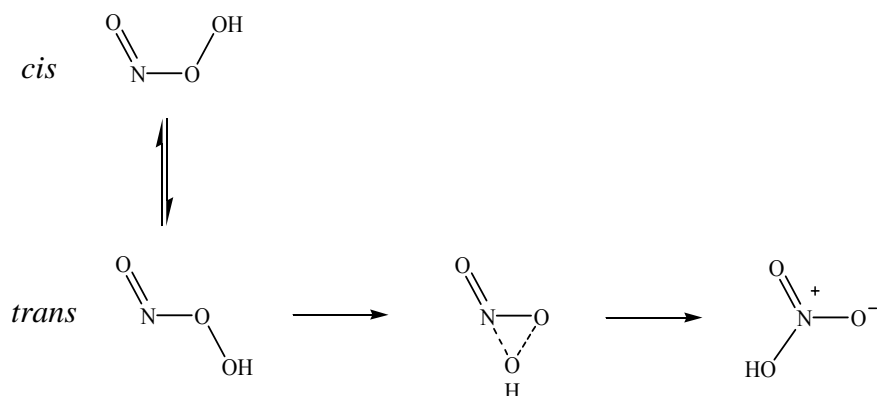
1.1. Introduction sur le peroxynitrite :

Le peroxynitrite (PN) est un composé chimique au fort potentiel oxydant ($E^\circ (\text{ONOOH}, \text{H}^+/\text{NO}_2^-, \text{H}_2\text{O}) = 1,4 \text{ V}$) [31]. Sa réactivité a été très étudiée mais reste encore mal connue car très complexe. Il a fait l'objet d'une attention particulière ces dernières années du fait de sa capacité à réaliser diverses réactions dites « cytotoxiques » (rupture des brins simple et double de l'ADN, peroxydation lipidique, nitration de protéines), associées à de nombreuses pathologies telles que les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), cardiovasculaires (infarctus, hypertension) ou inflammatoires (rejet de greffe, sclérose en plaque) [21].

1.1.1. Devenir du PN en solution aqueuse et en conditions physiologiques :

Sans activation par un acide de Lewis, ONOO^- est relativement stable sous sa forme déprotonée *cis*, énergétiquement plus favorable que la conformation *trans* (2-4 kcal.mol^{-1}). La barrière énergétique à franchir pour passer d'un conformère à l'autre est de 21 à

A. Isomérisation du PNH par mécanisme de recombinaison intramoléculaire :



B. Décomposition du PNH par rupture homolytique de la liaison O-O et formation d'une paire de radicaux :

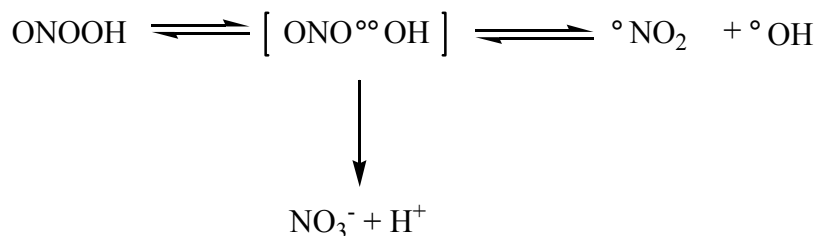


Figure III.1. Représentation schématique des deux mécanismes réactionnels proposés pour la décomposition du PN protoné (PNH). **A)** Isomérisation du PNH en acide nitrique par mécanisme de sphère interne. **B)** Rupture homolytique de la liaison O-O formant la paire de radicaux $\cdot\text{OH}$ et $\cdot\text{NO}_2$; 30 % des radicaux diffuseraient tandis que les 70 % restants recombineraient pour former de l'acide peroxyxynitreux et des nitrates.

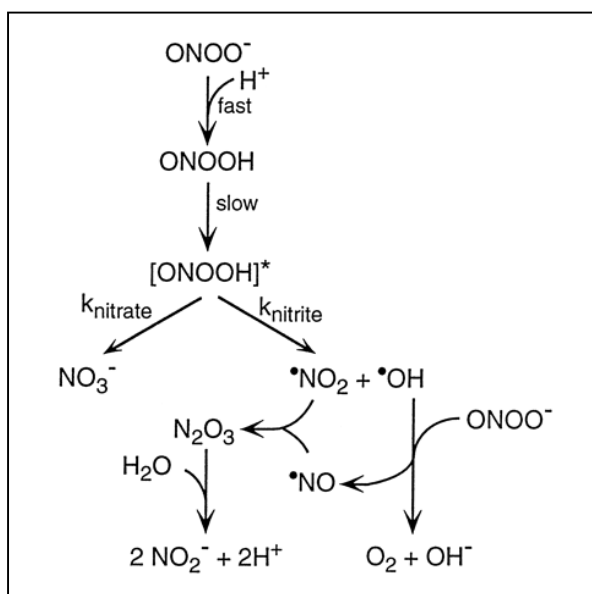


Figure III.3. Mécanisme proposé par l'équipe de B. Mayer pour la décomposition du PN en nitrates et nitrites en solution aqueuse [121].

27 kcal.mol⁻¹. Cette barrière s'abaisse à 12 kcal.mol⁻¹ lorsque le PN est protoné [126]. Ainsi, l'étape essentielle pour induire la décomposition du PN semble être la neutralisation partielle ou totale de sa charge. Deux mécanismes réactionnels sont ensuite proposés pour la décomposition du PN et sont présentés figure III.1.

Le premier mécanisme considère un réarrangement intramoléculaire de l'acide peroxyxynitrique (PNH) pour former l'acide nitrique (HNO₃), qui se dissocierait instantanément en nitrate (NO₃⁻) plus proton [127]. L'intermédiaire réactionnel actif dans ce mécanisme serait un état de transition [ONOOH]^{*} cyclique qui aurait des propriétés semblables à celles de HO[•] [121].

Le second mécanisme, initialement proposé par G. Merényi et J. Lind [128], passerait par une rupture homolytique de la liaison O-O du PNH avec formation d'une paire de radicaux HO[•] et [•]NO₂. 30 % des radicaux s'échapperaient de la cage tandis que les 70 % restants recombineraient pour former de l'acide peroxyxynitrique à nouveau et des nitrates [129].

La co-existence de ces deux mécanismes (isomérisation et rupture homolytique de PNH) est aujourd'hui encore très discutée. Cependant, il est clair que PN, pour se décomposer, nécessite une première étape d'activation correspondant à la neutralisation partielle ou totale de sa charge. En solution et en conditions physiologiques, les deux voies majeures d'activation de la décomposition du peroxyxynitrite correspondent à la fixation d'un proton H⁺ (dépendance au pH), et à la réaction du PN avec le CO₂ (fig. III.2).

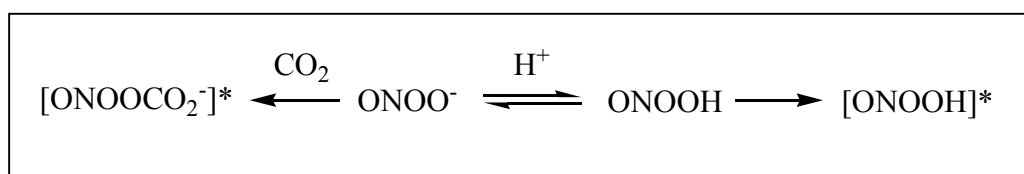


Figure III.2. Les deux voies majeures d'activation de la décomposition du PN en solution et en conditions physiologiques : fixation d'un proton (H⁺) ou réaction avec le CO₂ du milieu.

1.1.1.1. Dépendance au pH :

A pH physiologique, à 37 °C, et en absence de toute autre espèce dans le milieu, PN se décomposerait en 70 % nitrates (NO₃⁻) et 30 % nitrites plus dioxygène (2 NO₂⁻ + O₂). A pH<5 le seul produit de décomposition du PN est NO₃⁻. A pH basique, la formation de nitrites est favorisée, ainsi que par augmentation de la température ou de la concentration en PN [130]. La figure III.3 présente le mécanisme postulé par l'équipe de B. Mayer en 1997 pour expliquer la formation de ces espèces [121], combinant isomérisation et rupture homolytique de la liaison O-O du PNH.

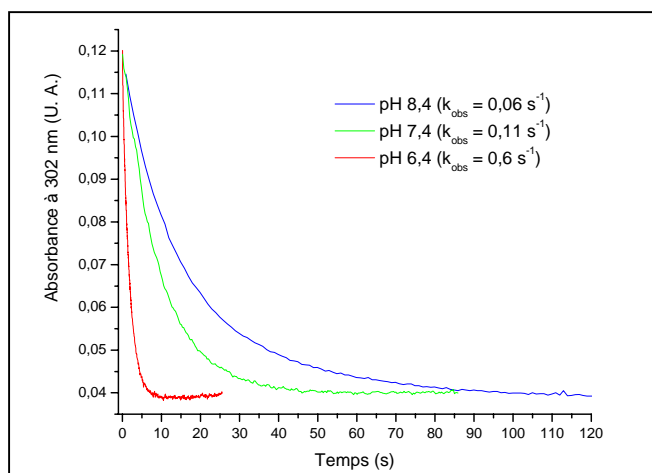


Figure III.4. Décomposition de 100 µM PN dans KPi 0,1 M -CO₂ à différentes valeurs de pH: pH 8,4 (bleu), pH 7,4 (vert), pH 6,4 (rouge).



$$PN + H^+ \leftrightarrow PNH \quad K_D = \frac{[H^+] \times [PN]}{[PNH]}$$

$$[PN] + [PNH] = [PN]_t$$

$$-\frac{d[PN]_t}{dt} = k_1 \times [PNH] = k_1 \times [PN]_t \times \frac{[H^+]}{[H^+] + K_D} = a \times [PN]_t$$

$$\text{avec } a = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_D} \times k_1$$

Equation III.1. La cinétique de décomposition du peroxynitrite seul en solution est modélisée par la fonction mono-exponentielle $[PN] = [PN]_0 \times e^{-at}$, avec (a) pour constante de vitesse.

	-CO ₂	+CO ₂	
pH	k _{déc} (s ⁻¹)	k _{déc} (s ⁻¹) Phase lente	k _{déc} (s ⁻¹) Phase rapide
8,4	0,06	n. d.	n. d.
7,4	0,11	0,60	2,96
6,4	0,60	n. d.	n. d.

Table III.1. Constantes de vitesse observées pour la décomposition du PN dans KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA à pH 8,4 et 6,4 en absence de CO₂, et à pH 7,4 en absence et en présence de 0,1 mM CO₂ dans le milieu. Dans le tableau (n. d.) signifie : non déterminé.

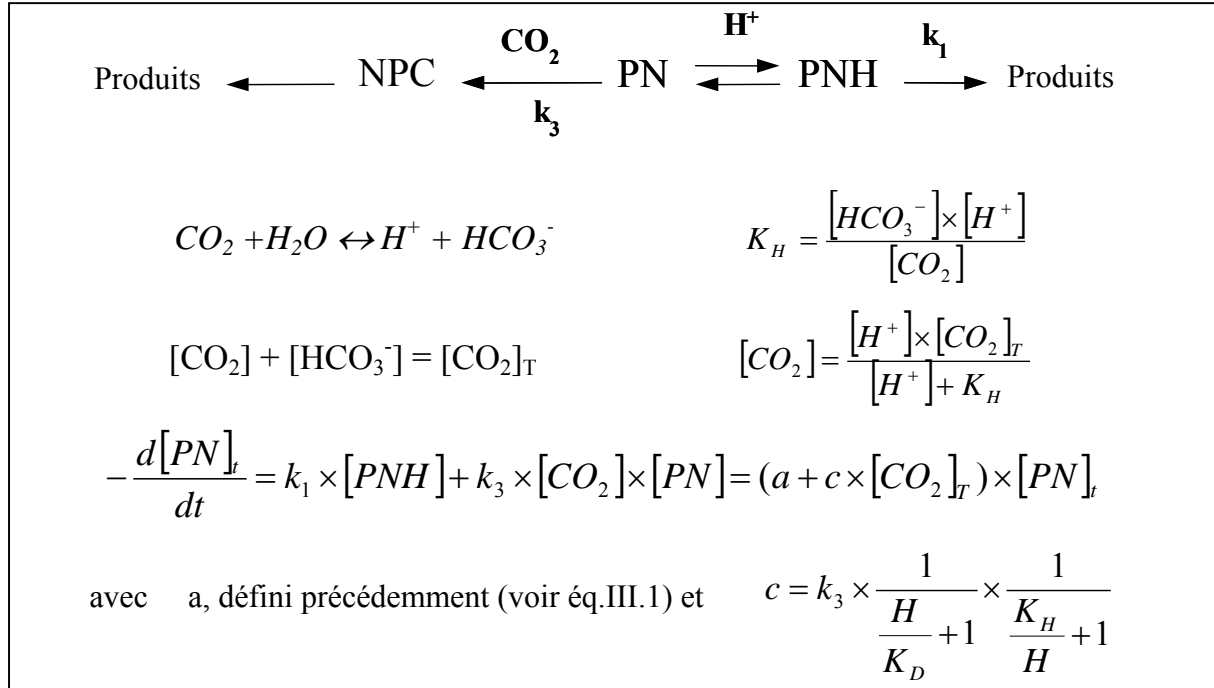
Quel que soit le mécanisme, plus le pH de la solution est acide, plus la vitesse de décomposition du PN est rapide, l'acide peroxyntireux se décomposant plus vite que le PN. Par ailleurs, il a été démontré que l'influence d'un acide de Lewis (ici H^+) est prépondérante sur le transfert direct d'un hydrogène au PN par un acide faible [131]. Le pKa du couple PNH/PN a été mesuré entre 6,5 et 6,8 [132, 133].

Pour vérifier ce résultat, nous avons réalisé des expériences de mélange rapide entre une solution de PN, dilué à 100 μM dans NaOH 0,01 N, et une solution tampon KPi 0,1 M à différentes valeurs de pH, toutes les solutions étant fraîchement dégazées à l'azote pour s'assurer de l'absence de CO_2 . La figure III.4 présente les cinétiques de décomposition du PN enregistrées à pH 6,4, 7,4 et 8,4, par suivi de la disparition de son maximum d'absorption à 302 nm. Les constantes cinétiques de décomposition du PN ont été extraites de chaque courbe par modélisation avec une fonction mono-exponentielle (eq. III.1) et sont reportées table III.1. Nous observons une augmentation de la vitesse de décomposition du PN avec l'acidité de la solution, et avons déterminé une valeur de pKa comprise entre 6,5 et 7 pour le couple PNH/PN. Nos conditions expérimentales reproduisent donc bien les données de la littérature. Par ailleurs, les variations de pH influençant les cinétiques de décomposition de $ONOO^-$, ce paramètre a été rigoureusement contrôlé durant notre étude.

1.1.1.2. Réaction du PN avec le CO_2 :

La seconde voie de décomposition du PN passe par la fixation quasi instantanée du CO_2 présent dans le milieu, et la formation de l'adduit nitrosoperoxyarbonate ($ONOOCO_2^-$, NPC) ($k = 60 s^{-1}$, en condition de concentration physiologique de CO_2). Ce composé va évoluer très rapidement ($k = 250 s^{-1}$) par rupture homolytique de la liaison O-O et former une cage de radicaux $CO_3^{\cdot-}$ et NO_2^{\cdot} [134], qui peuvent soit recombiner soit diffuser. Par exemple, les radicaux trioxocarbonates ($CO_3^{\cdot-}$) pourraient oxyder des cibles présentes dans le milieu, qui recombineraient ensuite avec les radicaux NO_2^{\cdot} , expliquant ainsi l'activité de nitration liée au PN. Puisque *in vivo*, la concentration en CO_2 est de 1 mM, il est probable que PN réagisse majoritairement suivant cette voie si il est synthétisé dans le milieu extérieur. En revanche, la synthèse *in situ* du PN, au site actif des NOSs, pourrait le protéger d'une interaction avec le CO_2 du milieu et éventuellement favoriser sa réaction directe avec des biomolécules.

Les équations cinétiques de la décomposition du PN en présence de CO_2 (eq III.2) indiquent que la décomposition du PN doit être modélisée par une fonction mono-exponentielle. La figure III.5 présente la cinétique de décomposition du PN, enregistrée à 302 nm, dans KPi 0,1 M pH 7,4 en présence de 0,1 mM CO_2 . Dans nos conditions expérimentales, la trace



Equation III.2. L'analyse aboutit à une modélisation mono-exponentielle de la décomposition du PN en présence de CO₂ par l'équation $[\text{PN}] = [\text{PN}]_0 \times e^{-(a+c \cdot [\text{CO}_2]) \cdot t}$, avec une constante de vitesse représentée par $(a + c \times \text{CO}_{2T})$. Cette constante de vitesse doit varier linéairement avec la concentration de CO₂ dans le milieu. Cependant deux cas de figure sont à considérer : 1) Si CO₂ >> PN; le terme $(c \times \text{CO}_{2T})$ prédomine, la plupart du PN réagit avec CO₂ et se décompose suivant la réaction (3). 2) Si PN ≥ CO₂, deux phases distinctes sont observées. Ce phénomène a été décrit par S. V. Lymar and J. K. Hurst [135]. La première phase correspondrait à la réaction du PN avec le CO₂ initialement présent dans le milieu. La constante de vitesse d'exprime alors comme $(a + c \times \text{CO}_{2T})$. Quand tout le CO₂ est consommé, PN se décomposerait seul en solution, suivant la réaction (1). Cette seconde phase serait en réalité plus complexe puisque PN réagirait avec des traces de CO₂, lentement régénéré à partir des carbonates présents en solution. La loi de vitesse évoluerait alors dans le temps suivant l'évolution complexe de l'équilibre entre les réactions (1) et (3).

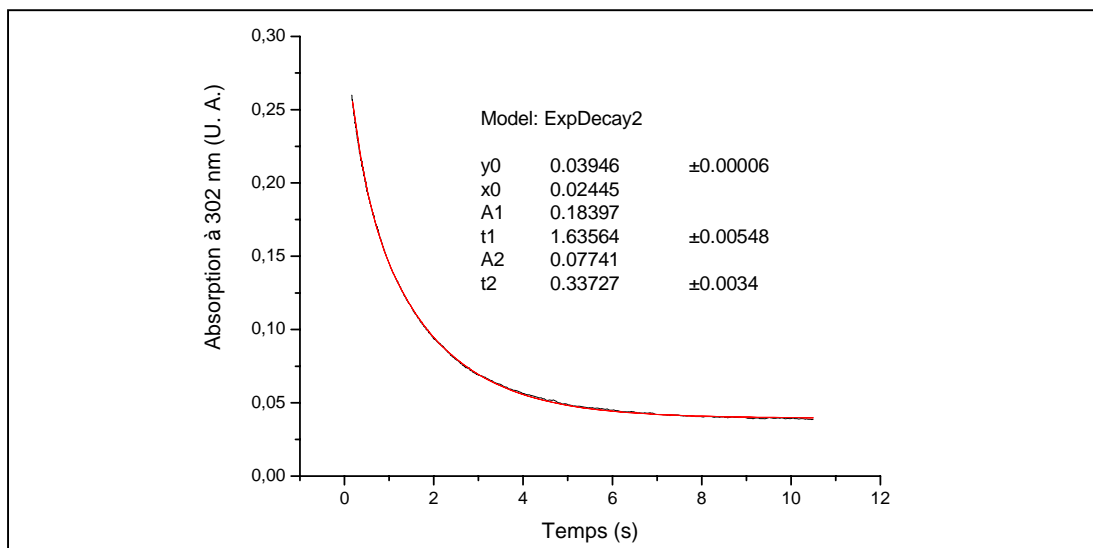


Figure III.5. Trace cinétique enregistrée à 302 nm lors de la décomposition de 100 µM PN dans KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA pH 7,4, en présence de 0,1 mM CO₂ dans le milieu. Modélisation de la cinétique de décomposition du PN par une fonction bi-exponentielle.

cinétique enregistrée est mal modélisée par une fonction mono-exponentielle, tandis qu'une fonction bi-exponentielle la représente parfaitement. S. V. Lymar et J. K. Hurst ont déjà observé ce phénomène [135] en condition de concentration sub-stœchiométrique en CO_2 par rapport à PN. Les auteurs ont proposé alors l'existence de deux phases distinctes pour la cinétique de décomposition du PN en présence de CO_2 . La première phase, rapide, correspondrait à la réaction du PN avec le pool de CO_2 initialement présent dans le milieu. La seconde phase, plus lente, interviendrait après consommation totale de ce CO_2 , et correspondrait à la décomposition du PN libre et à sa réaction avec des traces de CO_2 , régénéré à partir des carbonates présents dans la solution.

Les constantes cinétiques déterminées dans nos conditions expérimentales sont reportées table III.1 et semblent être en accord avec les hypothèses formulées par S. V. Lymar et J. K. Hurst. La constante de vitesse déterminée pour la phase rapide est près de 30 fois plus rapide que pour la décomposition du PN seul, ce qui prouve l'intervention du CO_2 dans la réaction. La constante de vitesse mesurée pour la phase lente, elle, est plus proche de celle déterminée pour la décomposition du PN en absence de CO_2 , mais reste cinq fois plus rapide, ce qui confirme la régénération lente de CO_2 dans le milieu.

1.1.1.3. Autres paramètres influençant la décomposition du PN :

D'autres paramètres sont à prendre en compte lors de l'étude des cinétiques de décomposition du PN. Par exemple, la nature et la concentration du tampon [131]. En effet une forte concentration en tampon augmente le pK_a apparent du PN. En conséquent la décomposition du PN à une valeur de pH donnée est accélérée. De même, le borate est un acide de Lewis qui amène le $\text{pK}_{a_{\text{app}}}$ du PN à 8. Ainsi les cinétiques de décomposition du PN seront plus rapides dans un tampon borate que dans un tampon phosphate, pour lequel le pK_a du PN reste inchangé ($\approx 6,8$). Une étude des cinétiques de décomposition du PN en fonction du pH doit donc se faire sans changer la nature du tampon.

Au-delà de $100\ \mu\text{M}$ PN, les cinétiques de décomposition du PN ne sont plus mono-exponentielles. En effet, à forte concentration il y aurait possible formation d'un adduit (dimère cyclique) entre ONOOH et ONOO^- [131]. Cependant cette association est plus lente que l'isomérisation de ONOOH en nitrates. Pour cette raison, en conditions physiologiques un tel adduit n'existerait pas. Néanmoins, lors de notre étude cinétique de la décomposition du PN nous avons pris garde à ne pas dépasser une concentration de $100\ \mu\text{M}$ PN.

En outre la présence d'autres oxydes d'azote pourrait modifier les cinétiques de décomposition du PN. Nous avons donc vérifié que les produits de décomposition du PN

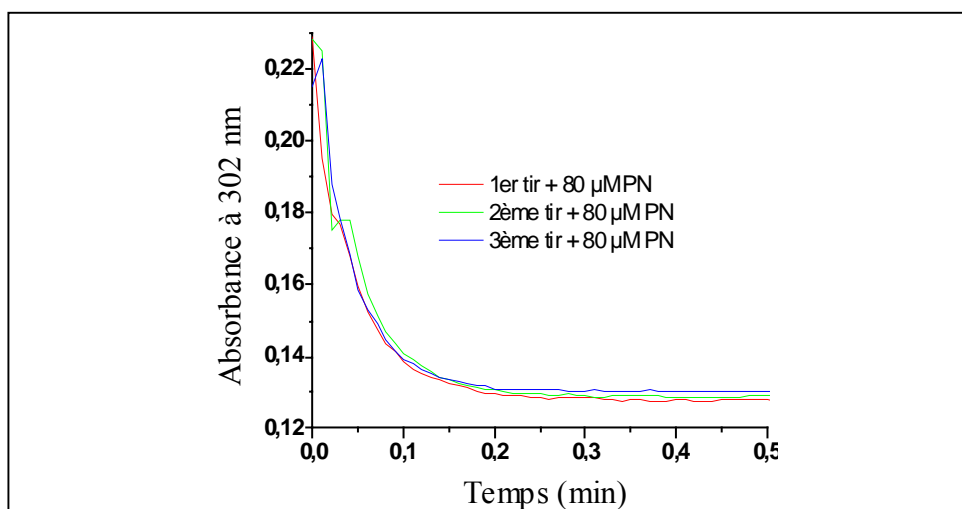


Figure III.6. Superposition des traces cinétiques enregistrées en spectroscopie d'absorption UV-visible à 302 nm lors de la décomposition d'additions successives de 80 μ M PN dans une même solution KPi 0,1 M pH 7,4 plus 0,2 M DTPA ($-\text{CO}_2$).

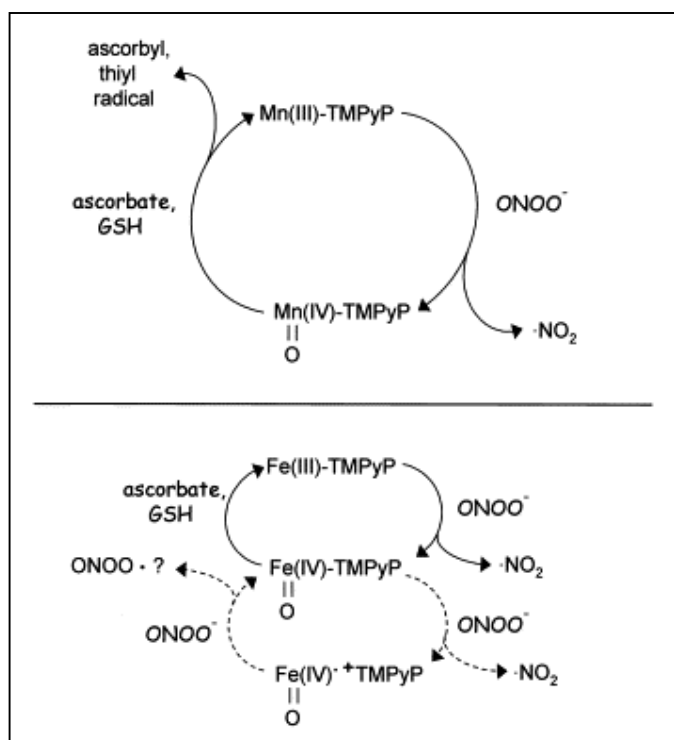


Figure III.7. Mécanismes catalytiques simplifiés, proposés pour la réaction du PN avec des porphyrines à manganèse (Mn^{III} , **A**) ou à fer (Fe^{III} , **B**). Issue de l'article de J. P. Crow [152].

n'interféraient pas avec son processus de décomposition. Pour cela, nous avons suivi par spectroscopie d'absorption UV-visible la décomposition de plusieurs additions successives de PN dans une solution de KPi 0,1 M pH 7,4. La figure III.6 montre que les traces cinétiques enregistrées à 302 nm pour chaque addition de PN se superposent. Ceci indique que, dans nos conditions expérimentales, les produits de décomposition du PN n'auraient pas d'effet sur les cinétiques de décomposition du PN.

1.1.2. Activation de la décomposition du PN par un métal :

Tout métal agissant en tant qu'acide de Lewis est à même d'activer ONOO^- . Ainsi de nombreuses études ont mis en évidence l'implication de composés inorganiques et de protéines, contenant un centre métallique, dans l'activation de la décomposition du PN. Nous proposons d'illustrer ces interactions par quelques exemples.

1.1.2.1. Par des métalloporphyrines :

Les métalloporphyrines à manganèse (Mn^{III}) ou à fer (Fe^{III}) activent la décomposition du PN avec des constantes de vitesse de second ordre comprises entre 10^6 et $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (table III.2). De manière générale, les métalloporphyrines réagissent préférentiellement avec PN, qu'avec sa forme protonée PNH [136].

L'équipe de J. T. Groves a été pionnière dans l'élucidation des mécanismes réactionnels des métalloporphyrines à Mn et à Fe avec PN, dont les modèles simplifiés sont présentés figure III.7. La réaction passerait par des intermédiaires à haut degré d'oxydation $\text{Mn}^{\text{IV}}=\text{O}$ et $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$. Les porphyrines à Mn nécessitent la présence d'un réducteur pour régénérer le complexe de départ. L'ascorbate et le glutathion, antioxydants naturels, ou encore les ions superoxyde générés *in vivo* en condition de stress oxydant, réaliseraient cette réaction. Dans ces conditions, la vitesse de réduction du complexe $\text{Mn}^{\text{IV}}=\text{O}$ n'étant pas cinétiquement limitante ($10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), les porphyrines à Mn décomposeraient PN de manière catalytique [137]. Les porphyrines à Fe peuvent réagir suivant le même mécanisme. Cependant, en condition d'excès de PN, les porphyrines à Fe ne nécessiteraient pas l'intervention d'un réducteur pour catalyser la décomposition du PN. Le catalyseur de la réaction serait le complexe $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, formé à l'issue d'une première étape plus rapide de réaction stoechiométrique entre le complexe Fe^{III} de départ et PN [138].

Ces systèmes, en plus d'activer la décomposition du PN, augmentent le potentiel d'oxydation (x 2) et de nitration (x 5) du PN pour des composés phénoliques (pH = 7,4) [139]. Le mécanisme proposé pour la réaction de nitration est présenté figure III.8. Il impliquerait la

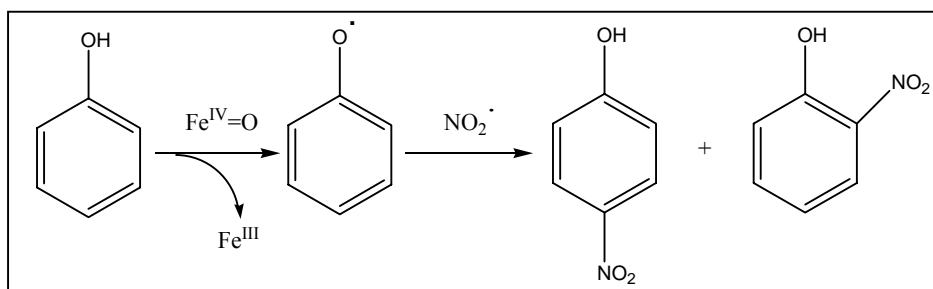


Figure III.8. Mécanisme de nitration de composés phénoliques par PN, catalysée par une métalloporphyrine à fer.

	k_{act}	pH	Réf	intermédiaire
Mn(III)TMPyP	$2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	7,4*	[137]	$\text{Mn}^{\text{IV}}=\text{O}$
Fe(III)TMPyP	$5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	7,4*	[138]	$\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$
oxoFe(IV)TMPyP	$1,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	7,4*	[138]	$\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O} (\pi^+)$
myéloperoxydase	$6,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} **$	7,2*	[140]	Composé II
lactoperoxydase	$3,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} **$	7,4*	[140]	Composé II
HRP	$3,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} **$	7,3*	[140]	Composés I et II
métmyoglobine	$2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	7,0 ; 20 °C	[141]	-
méthémoglobine	$1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	7,0 ; 20 °C	[141]	-

Table III.2. Constantes cinétiques d'activation (k_{act}) mesurées pour la réaction de décomposition du PN par différentes métalloporphyrines et métalloprotéines. (*) indique les expériences pour lesquelles les solutions n'ont pas été préalablement dégazées (présence de CO_2). (**) indique les constantes de vitesse correspondant à la formation d'un intermédiaire réactionnel et non à la décomposition du PN proprement dite. Mn(III)TMPyP : 5,10,15,20-tetrakis-(N-méthyl-4'-pyridyl)porphinatomanganèse(III). Fe(III)TMPyP : 5,10,15,20-tetrakis-(2,4,6-triméthyl-3,5-sulfonatophényle)porphinatoiron(III).

formation simultanée de complexes métalliques à l'état d'oxydation +4 et des radicaux $\cdot\text{NO}_2$. Les complexes $\text{Mn}^{\text{IV}}=\text{O}$ et $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ oxydèrent les phénols en radicaux phénoxyles qui recombinèrent ensuite rapidement avec les radicaux $\cdot\text{NO}_2$ pour former des produits nitrés. A notre connaissance aucune étude ne s'est intéressée au devenir de l'oxygène des complexes $\text{Mn}^{\text{IV}}=\text{O}$ et $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, qui nécessiterait la réalisation d'expériences à partir de PN marqué (^{18}O). Aucun produit d'hydroxylation de phénols n'ayant été observé, il semble sous-entendu qu'il se retrouve dans le solvant de la réaction.

1.1.2.2. Par des hémoprotéines :

Les métalloprotéines, présentes dans quasiment tous les tissus de l'organisme, sont à même d'activer PN *in vivo*. L'interaction du PN avec différentes hémoprotéines a suscité un intérêt particulier dans les quinze dernières années et est aujourd'hui relativement bien documentée. Plusieurs études rapportent une dépendance en pH de la réaction suggérant la fixation préférentielle de la forme protonée du PN au centre métallique [140, 141]. Ce résultat va à l'encontre des études menées sur les complexes modèles de métalloporphyrines (voir 1.1.2.1.), ce qui témoigne de l'influence exercée par l'ensemble de la protéine sur l'environnement de l'hème.

Deux familles enzymatiques se sont distinguées pour leur réactivité avec PN, intrinsèquement liée à la nature du ligand proximal porté par le fer. D'une part les hémoprotéines type hémoglobine et myoglobine avec un résidu histidine en ligand proximal, d'autre part les hémoprotéines type cytochromes P450 qui fixent une cystéine proximale.

S. Herold a réalisé une étude exhaustive de l'interaction du PN avec l'hémoglobine et la myoglobine [142, 143]. Ses résultats suggèrent une isomérisation catalytique du PN fixé au fer de l'hème formant 100 % de nitrates. N'ayant pas observé d'intermédiaire pouvant correspondre à un complexe du fer à haut degré d'oxydation, elle suggère que la réaction passe plutôt par un mécanisme concerté de recombinaison intramoléculaire du complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OONO}]$ [141]. Ainsi les globines n'auraient pas pour effet d'activer PN mais de le détoxifier.

Au contraire, un intermédiaire type oxoferryl $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ a été observé lors de la réaction de PN avec les cytochromes P450_{BM-3}, P450_{NOR}, la chloroperoxydase et la myéloperoxydase, avec un maximum d'absorption autour de 435 nm [140, 144, 145]. Pour l'ensemble de ces études, un mécanisme impliquant la formation des deux composés I et II a été proposé, soit suivant un mécanisme type métalloporphyrines à fer, soit par formation préalable d'un composé I (P450_{BM3}, myéloperoxydase). Cependant aucune étude cinétique exhaustive de la qualité de

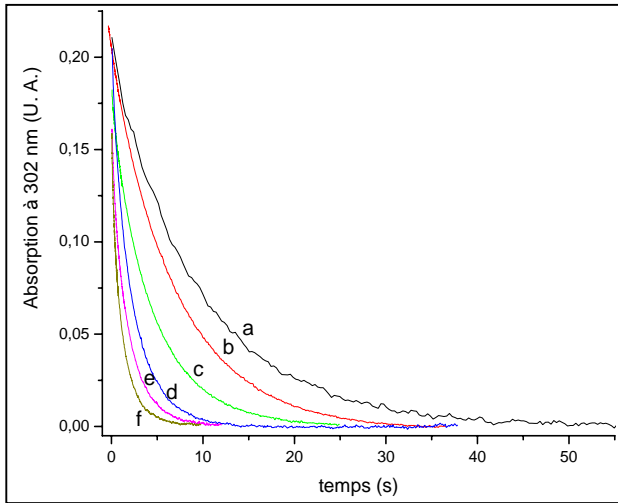


Figure III.9. Superposition des traces cinétiques enregistrées à 302 nm pour la décomposition du PN a) dans KPi 0,1 M pH 7,4 (- CO₂), b) + 0,5 μM iNOSoxy, c) + 1 μM iNOSoxy, d) + 2 μM iNOSoxy, e) + 3 μM iNOSoxy, f) + 4 μM iNOSoxy.

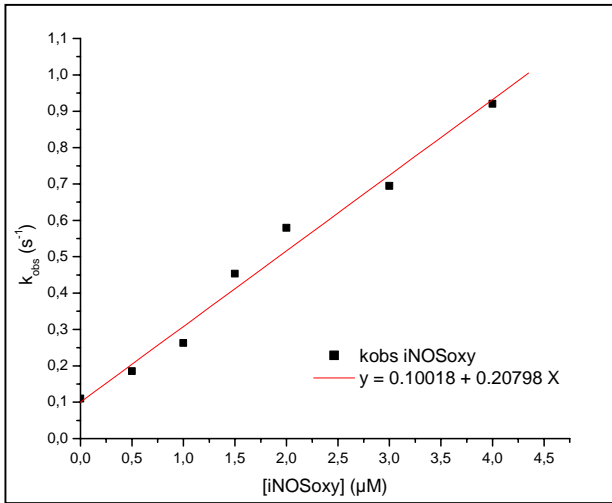
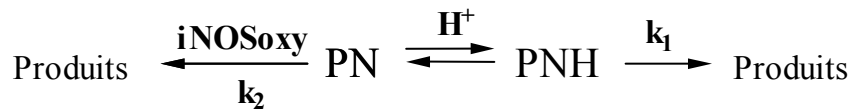


Figure III.10. Représentation des constantes de vitesse observées pour la décomposition du PN dans KPi 0,1 M pH 7,4 plus 0,3 mM DTPA, en fonction de la concentration en enzyme dans le milieu. La pente, calculée par modélisation linéaire des données, indique la constante de vitesse d'activation du PN par iNOSoxy.



$$-\frac{d[\text{PN}]_t}{dt} = k_1 \times [\text{PNH}] + k_2 \times [\text{iNOS}] \times [\text{PN}]$$

$$[\text{PN}] = [\text{PN}]_t \times \frac{K_D}{[H^+] + K_D}$$

$$-\frac{d[\text{PN}]_t}{dt} = (a + b \times [\text{iNOS}]) \times [\text{PN}]_t$$

avec a, défini précédemment (voir éq.III.1) et $b = \frac{k_2 \times K_D}{[H^+] + K_D}$

Equation III.3. La cinétique de décomposition du peroxyntirite en présence de iNOSoxy est modélisée par la fonction mono-exponentielle $[\text{PN}] = [\text{PN}]_0 \times e^{-(a+b[\text{iNOS}])t}$, avec pour constante de vitesse $(a + b \times \text{iNOS})$. Si iNOSoxy réagit avec l'acide peroxyntiriteux (PNH) la valeur de b change pour s'exprimer suivant (k_2/k_1) . Dans tous les cas, la constante de vitesse de décomposition du PN évolue linéairement par rapport à la concentration de iNOSoxy.

celle menée par S. Herold n'a été publiée sur l'interaction du PN avec des protéines de type hémithiolate. L'activation du PN par les hémithiolates a pour effet d'augmenter la réactivité de nitration du PN. Cette activité est justifiée par la formation concomitante d'un intermédiaire $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ et de radicaux $\cdot\text{NO}_2$ (fig. III.8). Par ailleurs, l'enzyme serait elle-même cible de cette réactivité de nitration puisque des résidus nitrotyrosine ont été détectés sur différentes protéines à centre hémithiolate telles que la prostacycline-synthase [146] ou les cytochromes $\text{P450}_{\text{BM-3}}$ et P450_{CAM} [144, 147], généralement accompagnés d'une inactivation de l'enzyme.

1.2. Activation du peroxynitrite par iNOSoxy : bilan cinétique.

Dans l'hypothèse d'une formation *in situ* de peroxynitrite par les NOSs, deux scénarii sont envisageables : i) NOS libère PN dans le milieu qui se décompose alors spontanément seul, ii) NOS active sa décomposition. L'isoforme inductible des NOSs, iNOSoxy, étant potentiellement celle qui forme le plus de PN, nous avons étudié les cinétiques de décomposition du PN en présence de iNOSoxy afin de discriminer entre les deux mécanismes.

1.2.1. Effet de la présence de iNOSoxy sur la cinétique de disparition du PN :

1.2.1.1. Effet de la concentration de iNOSoxy :

Nous avons étudié l'effet de la présence de iNOSoxy sur la cinétique de disparition du PN. Cette étude a été menée par *stopped-flow* couplé à la spectroscopie d'absorption UV-visible en suivant les cinétiques de disparition de l'absorption du PN à 302 nm (voir chapitre II, 2.). La figure III.9 présente les traces cinétiques enregistrées pour la décomposition du PN seul (a) et en présence de différentes concentrations de iNOSoxy allant de 0,5 (b) à 4 μM (f). Nous observons une accélération significative de la vitesse de décomposition du PN en présence de concentrations croissantes de iNOSoxy.

Chaque trace cinétique enregistrée a été modélisée par une fonction mono-exponentielle suivant l'équation III.3. Les constantes de vitesse k_{obs} ainsi obtenues ont été représentées figure III.10 en fonction de la concentration en iNOSoxy. L'évolution linéaire observée indique que la réaction entre iNOSoxy et le peroxynitrite est d'ordre 2. La pente de cette droite donne la constante de vitesse de la réaction entre PN et iNOSoxy (k_{act}), calculée à $21 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, à pH 7,4 et en absence de CO_2 .

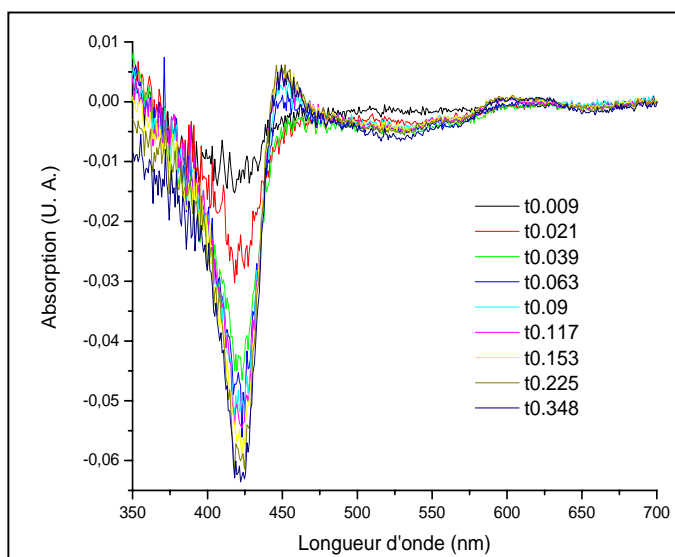


Figure III.11. Superposition des spectres de différences calculés pour les 350 premières ms de la réaction de 100 μM PN et 4 μM iNOSoxy dans KPi 0,1 M à pH 7,4 (-CO₂). L'absorption initiale de iNOSoxy à 420 nm diminue au profit de l'apparition d'un intermédiaire (I) qui a un maximum d'absorption autour de 445 nm.

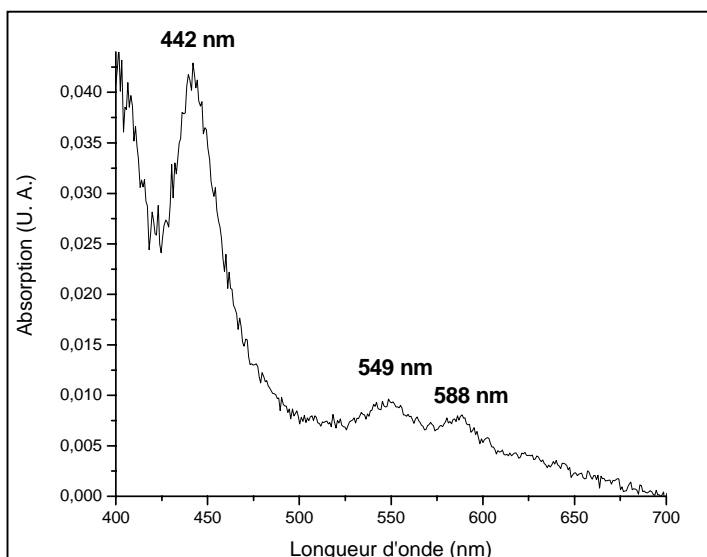


Figure III.12. Spectre calculé de l'intermédiaire observé par *stopped-flow* lors de la réaction de 100 μM PN avec 4 μM iNOSoxy dans KPi 0,1 M pH 7,4 en absence de CO₂. Au spectre enregistré à $t = 240$ ms a été soustrait 0,55 x du spectre initial ($t = 6$ ms).

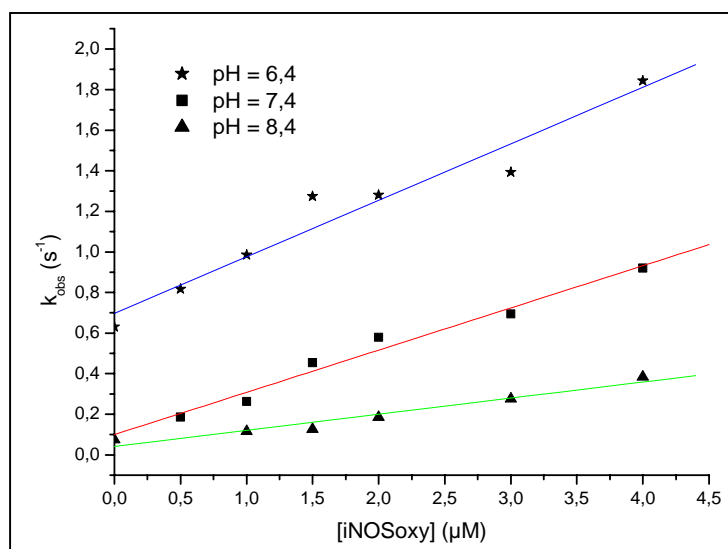


Figure III.13. Représentation graphique des constantes de vitesse de décomposition du PN (100 μM) en fonction de la concentration en iNOSoxy dans KPi 0,1 M (-CO₂) à différentes valeurs de pH : à pH 8,4 (vert), à pH 7,4 (rouge) et à pH 6,4 (bleu).

pH	$k_{\text{déc}}$ (s ⁻¹) décomposition PN	k_{act} (10 ⁴ M ⁻¹ .s ⁻¹) activation par iNOSoxy
8,4	0,042 \pm 0,020	8 \pm 1
7,4	0,10 \pm 0,04	21 \pm 2
6,4	0,70 \pm 0,06	28 \pm 3

Table III.3. Constantes cinétiques d'activation du PN par iNOSoxy à différentes valeurs de pH. Ces valeurs sont obtenues par modélisation linéaire des données de la figure III.13. L'ordonnée à l'origine indique la valeur de la constante de décomposition du PN ($k_{\text{déc}}$) ; la pente de la droite représente la constante de vitesse d'activation du PN par iNOSoxy (k_{act}).

Pour comparaison, iNOSoxy active la décomposition du PN 7 fois plus vite que la méthmyoglobine et 17 fois plus vite que la méthémoglobine [141].

1.2.1.2. Observation d'un intermédiaire (I) :

La superposition des 750 spectres enregistrés au cours de la décomposition du PN nous permet de corrélérer la décomposition du PN à des transitions du spectre d'absorption de l'hème. La figure III.11 présente la superposition des spectres de différences obtenus entre 9 et 348 ms au cours de la mesure, après soustraction du spectre initial. Nous observons la disparition de l'absorption de iNOSoxy native à 420 nm au profit de la formation d'un intermédiaire (I) absorbant autour de 445 nm. Le spectre de cette espèce a été calculé (voir chapitre II, 2.3) et est présenté figure III.12. Par ce calcul deux nouvelles bandes d'absorption sont mises en évidence, à 549 et 588 nm, et le maximum d'absorption attribué à la bande de Soret se situe à 442 nm. Nous discuterons plus loin de la nature potentielle de cet intermédiaire (voir 1.3. et 2.). Cependant nous pouvons d'ores et déjà suggérer le passage par un complexe à haut degré d'oxydation du fer au cours de la réaction.

1.2.2. Effet du pH :

La cinétique de décomposition du PN en présence de iNOSoxy a été étudiée à d'autres valeurs de pH. La constante de vitesse catalytique augmente d'un facteur 3,5 entre les pHs 8,4 et 6,4 (fig III.13, table III.3), ce qui semble indiquer que la forme protonée du PN, l'acide peroxynitreux, réagit préférentiellement avec iNOSoxy. Ce résultat est similaire aux observations rapportées dans l'étude de l'interaction du PN avec d'autres hémoprotéines (voir 1.1.3.2.).

1.2.3. Effet de la concentration en PN :

Nous avons également étudié les variations des vitesses de décomposition du PN par iNOSoxy en fonction de la concentration en PN. Dans ces conditions, toutes les cinétiques de décomposition du PN ont toujours été parfaitement modélisées par une fonction mono-exponentielle. Pour une concentration donnée de iNOSoxy (1,5 μ M), nous observons un ralentissement de la réaction à mesure que la concentration de PN augmente (fig. III.14).

La première hypothèse envisagée pour expliquer la diminution de la vitesse de décomposition du PN par iNOSoxy est une inactivation de l'enzyme par PN. Or, la modélisation mono-exponentielle des cinétiques indique que la concentration de iNOSoxy active ne peut pas varier au cours du temps (éq. III.3). Ainsi si une inactivation de l'enzyme a lieu, elle doit

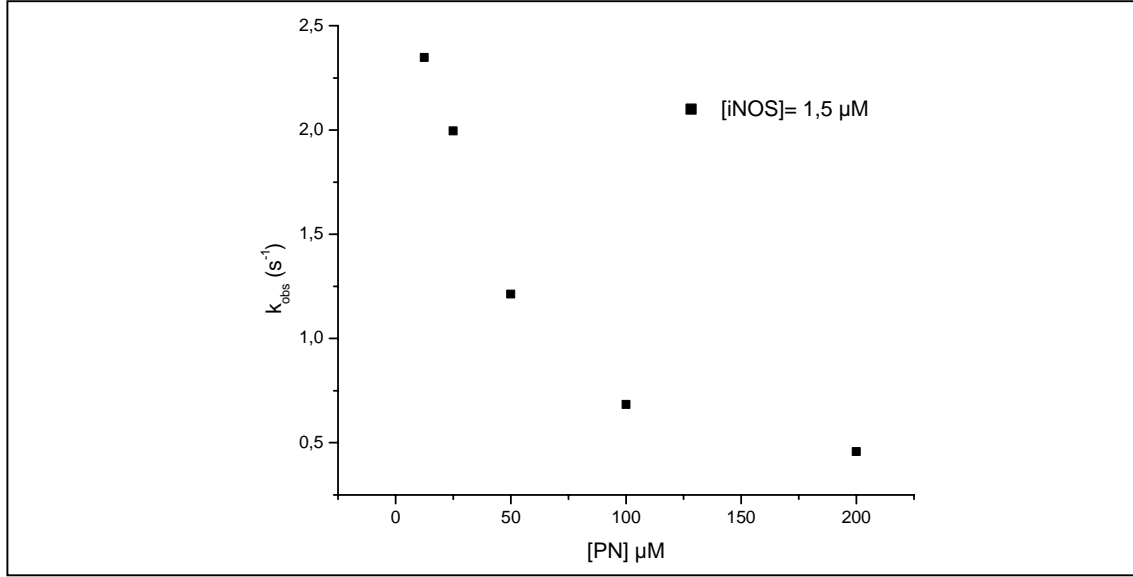
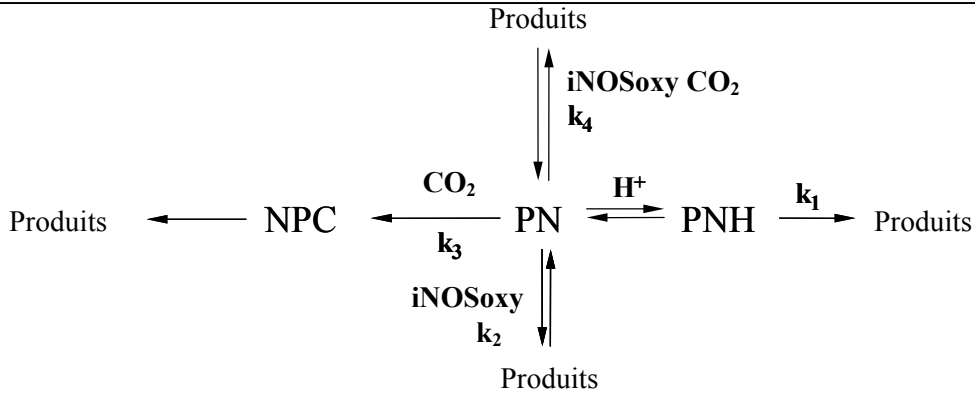


Figure III.14. Représentation graphique des constantes de vitesse observées pour la décomposition du PN par 1,5 μM iNOSoxy en fonction de la concentration en PN dans KPi 0,1 M (-CO₂) à pH 7,4.



$$-\frac{d[\text{PN}]_t}{dt} = k_1 \times [\text{PNH}] + k_3 \times [\text{CO}_2] \times [\text{PN}] + k_2 \times [\text{iNOS}] \times [\text{PN}] + k_4 \times [\text{iNOS}] \times [\text{CO}_2] \times [\text{PN}]$$

$$-\frac{d[\text{PN}]_t}{dt} = (a + b \times [\text{iNOS}] + c \times [\text{CO}_2]_T + d \times [\text{iNOS}] \times [\text{CO}_2]_T) \times [\text{PN}]_t$$

avec a, b, c, définis précédemment (voir éq. III.2-3) et
$$d = k_4 \times \frac{1}{\frac{[H^+]}{K_D} + 1} \times \frac{1}{\frac{K_H}{[H^+]} + 1}$$

Equation III.4. La cinétique de décomposition du PN en présence de iNOSoxy et CO₂ est modélisée par une fonction mono-exponentielle $[\text{PN}] = [\text{PN}]_0 \times e^{-kt}$. La constante de vitesse k de la réaction s'exprime: $(a + b \times [\text{iNOS}] + c \times [\text{CO}_2]_T + d \times [\text{iNOS}] \times [\text{CO}_2]_T)$. En conséquence, la constante de vitesse de disparition du PN doit varier linéairement en fonction des concentrations en iNOSoxy et en CO₂. Là encore, deux cas de figure sont à considérer : i) Si $[\text{CO}_2]_T \gg [\text{PN}]$, les termes qui dépendent de la concentration en CO₂ seront prépondérants et la plupart du PN va réagir avec le CO₂ pour se décomposer suivant les réactions 3 et 4. ii) Si $[\text{PN}] \geq [\text{CO}_2]_T$, nous devrions observer deux phases. La première phase correspondrait à la réaction du PN avec le CO₂ suivant les réactions 3 et 4. La deuxième phase interviendrait après consommation du CO₂ initialement en solution. PN se décomposerait alors suivant une autre loi de vitesse, prenant en compte la décomposition du PN seul (réaction 1), son activation par iNOSoxy (réaction 2) et sa réaction avec des traces de CO₂ lentement régénéré à partir des carbonates de la solution (réactions 3 et 4). Puisque la vitesse de régénération du CO₂ est lente comparée à l'activation du PN par iNOSoxy, cette seconde phase devrait correspondre majoritairement à l'interaction entre PN et iNOSoxy (réaction 2) dont la constante de vitesse s'exprime: $(a + b \times [\text{iNOS}])$.

intervenir après la décomposition totale du PN et ne peut donc expliquer le ralentissement des cinétiques.

L'autre hypothèse est de considérer qu'après addition du PN, deux voies de décomposition sont en compétition : une décomposition spontanée du peroxyinitrite et une décomposition activée par iNOSoxy. Cette dernière est limitée par la concentration en iNOSoxy et par la vitesse d'activation du PN. Il existe donc un flux maximum de PN activé par iNOSoxy. Si la concentration en PN augmente, le surplus de PN par rapport au flux maximum ne pourra être pris en charge par iNOSoxy et se décomposera seul. La vitesse de décomposition spontanée du PN étant plus lente que la réaction avec iNOSoxy, la vitesse globale de la décomposition du PN apparaîtra plus faible, ce qui est en accord avec nos résultats expérimentaux.

1.2.4. Effet de la présence de CO₂ :

Nous avons également étudié l'effet de iNOSoxy sur les cinétiques de décomposition du PN en présence de 0,1 mM CO₂. La mesure des constantes de vitesse a été réalisée comme précédemment (voir chapitre II, 2.2.). En présence de CO₂ et de iNOSoxy, les cinétiques de décomposition du PN ont été modélisées par une fonction bi-exponentielle (eq. III.4). Deux phases sont donc mises en évidence pour la réaction, une phase rapide et une phase lente, qui dépendent toutes deux de la concentration en iNOSoxy (fig. III.15, table III.5).

La phase rapide est caractérisée par une cinétique de décomposition spontanée du PN 30 fois plus rapide ($2,8 \text{ s}^{-1}$), similaire à celle déterminée en absence de iNOSoxy (voir 1.1.1.2.) ce qui confirme l'implication du CO₂, et une constante d'activation par iNOSoxy de $62,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, soit trois fois supérieure à celle mesurée en absence de CO₂. La constante d'activation du PN par iNOSoxy pendant la phase lente est proche de celle déterminée en absence de CO₂ ($22,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), ce qui suggère que l'activation du PN par iNOSoxy reste majoritaire et plus rapide que la régénération du CO₂ par les carbonates en solution. Les deux phases correspondraient donc à l'activation du PN en présence (phase rapide) et en absence (phase lente) de CO₂. La proportion de ces deux phases l'une par rapport à l'autre, en considérant l'amplitude de chaque fonction exponentielle, est constante d'une expérience à l'autre. Ceci correspond à ce qui était attendu si nous développons l'hypothèse de S. V. Lymar et J. K. Hurst [135] (voir 1.1.1.2.). En effet, puisque la concentration initiale de CO₂ ne varie pas d'une expérience à l'autre, le seul paramètre qui varie est la concentration en enzyme. La concentration en iNOSoxy ne modifiant pas la proportion entre chaque phase, il semble donc que PN réagisse avec tout le CO₂ initialement présent, le complexe NPC formé

pH	iNOSoxy substrat / co-facteur	$k_{\text{d}\text{éc}}$ (s^{-1}) décomposition PN	k_{act} ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) activation par iNOSoxy
7,4	- / -	$0,10 \pm 0,04$	21 ± 2
	+ H ₄ B	$0,05 \pm 0,04$	22 ± 2
	+ Arg	$0,15 \pm 0,03$	$8,5 \pm 1$
	+ citrulline	$0,16 \pm 0,01$	$7,0 \pm 0,5$
	+ Arg + H ₄ B	$0,12 \pm 0,01$	$1,8 \pm 0,3$

Table III.4. Constantes de vitesse calculées pour l'activation du PN par iNOSoxy dans KPi 0,1 M pH 7,4 plus 0,3 mM DTPA (- CO₂) en conditions saturantes de Arg, Cit, H₄B, Arg et H₄B.

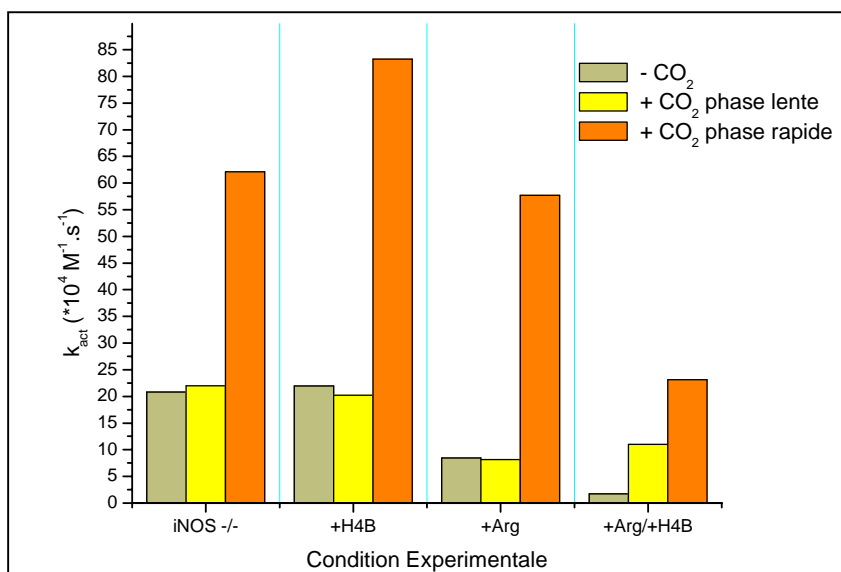


Figure III.15. Représentation graphique des constantes de vitesse calculées pour les phases rapides (orange) et lentes (jaune) observées lors de l'activation du PN par iNOSoxy dans KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA, en présence de 0,1 mM CO₂ à pH 7,4. Différentes conditions expérimentales ont été testées pour iNOSoxy: en absence de substrat et de co-facteur (iNOS -/-), en conditions saturantes de Arg (+Arg), de H₄B (+H₄B), de Arg et H₄B simultanément (+Arg/+H₄B). Pour comparaison, les valeurs obtenues en absence de CO₂ dans le milieu sont reportées (vert).

iNOSoxy substrat / co-facteur	$k_{\text{d}\text{éc}}$ (s^{-1}) décomposition PN	$k_{\text{d}\text{éc}}$ (s^{-1}) décomposition NPC	k_{act} ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) PN	k_{act} ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) NPC
- / -	$0,61 \pm 0,04$	$2,8 \pm 0,2$	22 ± 2	62 ± 8
+ H ₄ B	$0,57 \pm 0,08$	$2,6 \pm 0,1$	20 ± 3	83 ± 5
+ Arg	$0,83 \pm 0,04$	$2,6 \pm 0,2$	8 ± 2	58 ± 7
+ Arg + H ₄ B	$0,33 \pm 0,06$	$1,5 \pm 0,04$	11 ± 2	23 ± 2

Table III.5. Constantes cinétiques d'activation du PN par iNOSoxy dans KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA en présence de 0,1 mM CO₂ à pH 7,4, en absence de substrat et de co-facteur, et en conditions saturantes de Arg, H₄B, Arg et H₄B.

réagissant ensuite avec iNOSoxy. Il n'y aurait donc pas, *a priori*, de compétition entre iNOSoxy et le CO₂ pour l'activation du PN.

1.2.5. Influence de l'environnement de l'hème :

L'activité enzymatique des NOSs est extrêmement dépendante des substrats, produits et co-facteurs fixés au site actif. Ce sont eux qui contrôlent entre autre le transfert d'électrons du domaine réductase, le partitionnement entre cycles NO et RNSs et l'oxydation du complexe Fe^{II}-NO (voir chapitre I). Il est donc indispensable de déterminer si ils peuvent modifier la réactivité entre le peroxyinitrite et iNOSoxy.

Nous avons mené la même étude cinétique de décomposition du PN en présence de concentrations saturantes d'arginine, citrulline et/ou H₄B. Dans chaque cas nous avons déterminé la constante d'activation de la décomposition du PN par iNOSoxy (voir chapitre II, 2.2.). Les résultats sont présentés table III.4. La vitesse d'activation du PN par iNOSoxy est la même en présence et en absence de H₄B. Sachant que H₄B assure 100 % de dimérisation des NOSs, ce résultat nous permet d'exclure l'hypothèse selon laquelle l'activation du PN par iNOSoxy native serait due à la réactivité des monomères de NOS. Par ailleurs l'activation du PN par iNOSoxy diminue d'un facteur trois si l'arginine ou la citrulline se fixent dans la poche de l'hème. Nous pouvons exclure une réaction non spécifique entre ces substrats et PN puisque la constante de vitesse de décomposition du PN seul ne varie pas significativement en leur présence (table III.3). Cet effet d'inhibition est encore amplifié lors de la présence simultanée de Arg et H₄B. Dans ces conditions la vitesse d'activation de PN par iNOSoxy diminue d'un facteur 11 par rapport à iNOSoxy native. Ainsi, si la présence du co-facteur H₄B ne modifie pas la capacité de iNOSoxy à activer la décomposition du PN, la fixation de Arg ou citrulline dans la poche distale de l'hème réduit significativement l'activation du PN.

L'étude de l'activation du PN en présence de conditions saturantes de Arg et/ou H₄B a également été menée en présence de CO₂. Dans ces conditions les traces cinétiques enregistrées à 302 nm ont été modélisées par une fonction bi-exponentielle, témoignant de l'existence des deux phases décrites précédemment (voir 1.1.1.2.): une phase rapide correspondant à la présence de CO₂ dans le milieu, et une phase lente intervenant après épuisement de la concentration initiale de CO₂. Les constantes de vitesse déterminées pour les deux phases évoluent linéairement avec la concentration en iNOSoxy. La pente de ces droites donne la valeur de la constante d'activation du PN par iNOSoxy en présence de CO₂ (phase rapide), et après épuisement de la concentration initiale de CO₂ (phase lente). Les résultats sont présentés figure III.15 et table III.5. Encore une fois, les constantes de vitesse mesurées

pour la phase lente restent proches de celles déterminées en absence de CO₂, ce qui suggère que l'activation du PN par iNOSoxy reste majoritaire et plus rapide que la régénération du CO₂ par les carbonates en solution. L'effet de la fixation seule de Arg ou H₄B ne semble pas affecter la phase rapide. Néanmoins, leur présence simultanée diminue significativement l'activation du PN par l'enzyme en présence de CO₂.

L'ensemble des résultats obtenus jusqu'ici montre que iNOSoxy active la décomposition du PN. Ainsi, dans le cas d'une synthèse *in situ* de PN par l'enzyme, nous suggérons qu'il ne soit pas libéré mais activé par l'enzyme. La question qui se pose à présent est de savoir si cette activation par iNOSoxy change la réactivité du PN ou encore quelle est la chimie du système {PN + iNOSoxy}.

1.3. Réactivité du système {peroxyinitrite + iNOSoxy} :

Déterminer la réactivité du PN quand il est activé par iNOSoxy c'est apporter des éléments de réponse sur la réactivité du système Fe^{II}-NO lorsqu'il est oxydé. Cependant il s'agit également de comprendre quel peut être le mécanisme d'activation du PN par iNOSoxy, et en particulier de discuter la nature de l'intermédiaire (I) observé par *stopped-flow* (voir 1.2.1.2.). Par ailleurs, la modification de la réactivité du PN en présence de NOS serait une preuve supplémentaire de la prise en charge du PN par le fer de l'hème.

Les réactions d'oxydation à un électron, à deux électrons et la réaction de nitration du PN sont parmi les mieux décrites. Ainsi, l'augmentation de la réactivité d'oxydation à deux électrons du PN, en présence d'un centre Fe^{III}, est un argument indiquant le passage par un intermédiaire type composé I (Fe^{IV}=O, radical II^{•+}) accompagné de la formation de nitrates. Au contraire, l'augmentation de la réactivité d'oxydation à un électron du PN dans ces conditions, suggère le passage par un intermédiaire type composé II, oxoferryl (Fe^{IV}=O), avec libération de radicaux ·NO₂. De plus, comme nous l'avons précédemment décrit (voir 1.1.2.), en absence de CO₂ le système {Fe^{IV}=O···NO₂} serait responsable de l'activité de nitration du PN. Oxydation à un électron et nitration seraient alors en compétition, la réactivité dépendant de l'échappement des radicaux ·NO₂ [148].

1.3.1. Réaction d'oxydation à deux électrons :

PN oxyde le marqueur DHR en rhodamine par le biais d'une réaction d'oxydation à deux électrons. Nous avons vérifié cette activité en faisant réagir DHR avec des concentrations croissantes de PN à pH 7,4, en absence de CO₂. La production de rhodamine est mesurée par

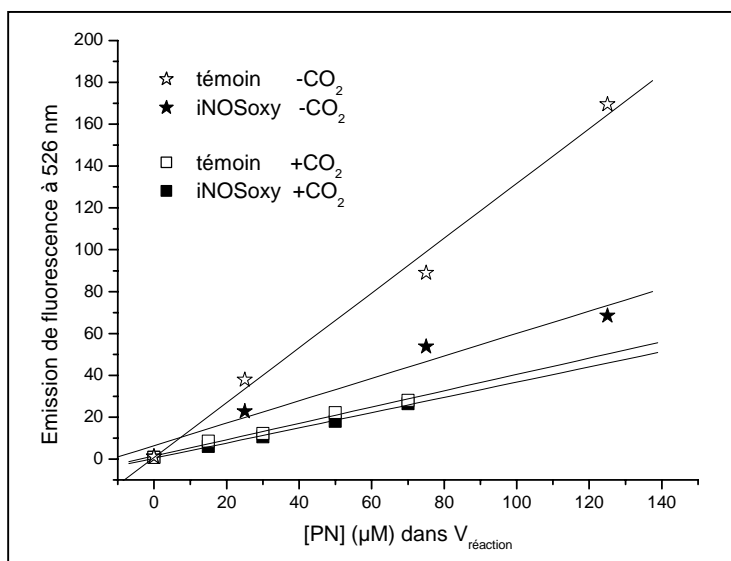


Figure III.16. Réactivité d'oxydation à deux électrons du PN par oxydation de la dihydrorhodamine (DHR) en rhodamine. La formation de rhodamine est mesurée par spectroscopie de fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 526 \text{ nm}$). L'expérience a été menée en absence (témoin) et en présence de iNOSoxy, en absence et en présence de 1 mM CO₂.

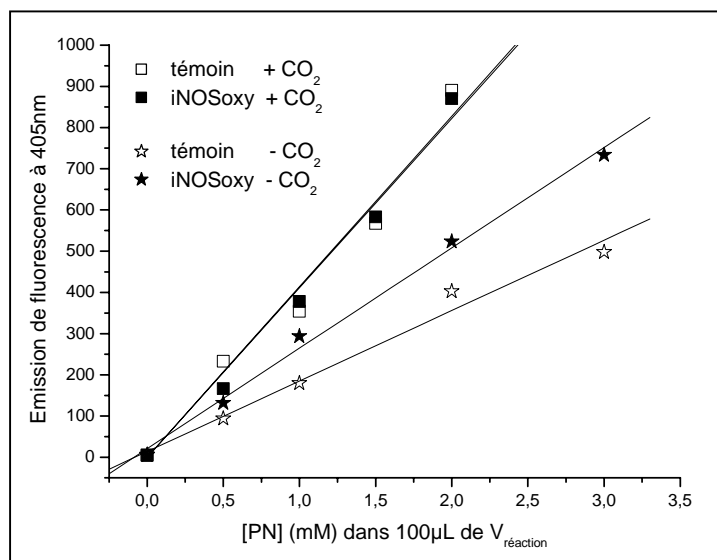


Figure III.17. Réactivité d'oxydation à un électron du PN par dimérisation de l'acide hydroxyphénylacétique (HPA). La formation des dimères de HPA est mesurée par spectroscopie de fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 326 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 405 \text{ nm}$). L'expérience a été menée en absence (témoin) et en présence de iNOSoxy, en absence et en présence de 1 mM CO₂.

spectroscopie de fluorescence (voir chapitre II, 3.1.1.). L'oxydation de DHR est liée à la seule réactivité du PN puisque aucune production de rhodamine n'est détectée pour les échantillons témoins ayant fait réagir DHR avec du PN préalablement décomposé. En présence de 20 μM iNOSoxy, nous avons observé une diminution de 60 % de la production de rhodamine par le PN (fig. III.16). INOSoxy modifie donc la réactivité du peroxyntirite. Les échantillons « iNOSoxy » en présence de PN préalablement décomposé ne permettent pas la production de rhodamine ce qui exclut l'éventualité d'une réaction d'oxydation à deux électrons à partir de ce système. L'ensemble de ces résultats suggère que l'intermédiaire (I) observé lors des expériences de mélanges rapides n'est vraisemblablement pas un composé I, $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ (π^+). Ces expériences ont été répétées en présence d'un excès de CO_2 dans le milieu. L'inhibition de l'oxydation de DHR par le PN est encore plus marquée avec 70 % de rhodamine en moins formée par rapport à la réaction du PN seul en absence de CO_2 , ce qui est en accord avec la littérature. En effet NPC, formé après réaction du PN avec le CO_2 , évolue rapidement vers la rupture homolytique de la liaison ONO-OC(O)O^- , libérant les radicaux $\cdot\text{NO}_2$ et $\text{CO}_3^{\cdot-}$ dans le milieu. Ceci a pour effet de défavoriser les processus d'oxydation à deux électrons. La présence simultanée de CO_2 et iNOSoxy n'induit pas d'inhibition supplémentaire. Ainsi si iNOSoxy active NPC, formé lorsque PN est en présence de CO_2 (voir 1.2.4.), elle ne modifie pas sa réactivité. L'ensemble de ces résultats suggère que l'activation du PN par iNOSoxy est similaire à celle observée pour le CO_2 et favorise la coupure homolytique de la liaison O-O du PN.

1.3.2. Réaction d'oxydation à un électron :

L'activité d'oxydation à un électron du PN est étudiée *via* sa réaction avec le marqueur HPA. Les dimères de HPA formés (2,2'-dihydroxybiphenyl-5,5'-diacétate ou di-HPA), sont détectés par spectroscopie de fluorescence (voir chapitre II, 3.1.2.). Nous observons une augmentation linéaire de l'intensité de fluorescence de di-HPA avec la quantité de PN réagissant, à pH 7,4 et en absence de CO_2 (fig. III.17). Cette activité est bien due au PN puisque aucune détection de di-HPA n'est observée pour les échantillons témoins ayant fait réagir HPA avec du PN préalablement décomposé. En présence de iNOSoxy, 40 % de di-HPA supplémentaires sont formés (fig. III.17). INOSoxy modifie donc également le pouvoir d'oxydation à un électron du PN, suggérant cette fois le passage par un intermédiaire type composé II, $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$.

Par ailleurs, une production de di-HPA est observée dans les échantillons « PN décomposé plus iNOSoxy ». Elle correspond à 50 % de la production de di-HPA observée en présence de

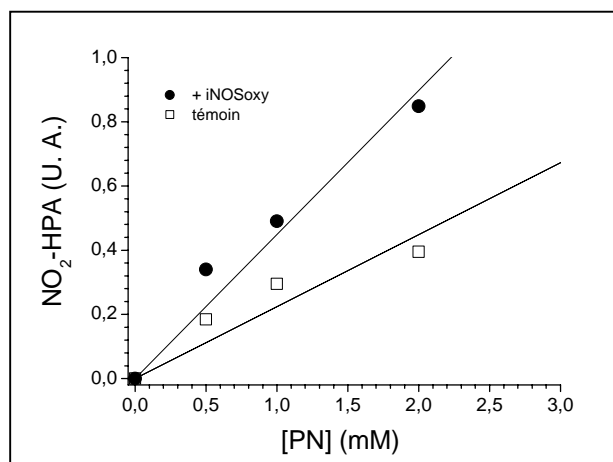


Figure III.18. Réactivité de nitration du PN avec HPA. La formation de nitro-HPA a été observée à 280 et 365 nm par chromatographie HPLC couplée à la spectroscopie d'absorption UV-visible. L'expérience a été réalisée en absence (témoin) et en présence de iNOSoxy.

PN. Les solutions de PN décomposé ne contiennent *a priori* que des nitrites et des nitrates et l'oxydation de HPA par iNOSoxy ne peut être liée à ces produits de décomposition. Nous suggérons donc une contamination des solutions commerciales de PN par un oxydant type H_2O_2 à même de réagir avec iNOSoxy pour oxyder HPA.

En présence de CO_2 dans le milieu, + 68 % de di-HPA est formé au cours de la réaction du PN avec HPA. Ce résultat est en accord avec la littérature, comme précédemment décrit (1.1.1.2.). Les radicaux $\cdot NO_2$ et $CO_3^{\cdot-}$, formés par réaction du PN avec CO_2 , ont un fort potentiel oxydant et une durée de vie relativement longue, ce qui leur permet d'oxyder (à un électron) les composés cibles du milieu [149]. Une fois encore nous n'observons pas d'effet supplémentaire de iNOSoxy sur la réactivité du PN en présence de CO_2 .

Nous avons effectué la même série de mesures à partir de iNOSoxy en conditions saturantes de Arg et H_4B (résultats non présentés). Ces expériences n'ont pas été validées du fait de leur non-reproductibilité et de l'observation d'un déplacement du maximum d'émission de fluorescence entre 425 et 445 nm. Cette émission de fluorescence ne correspond pas à la formation de di-HPA. Le co-facteur H_4B étant cible lui-même d'une oxydation par PN, pour former le composé H_2B , nous suggérons que ces mesures soient faussées par sa présence [150]. En effet, dans nos conditions expérimentales, le maximum d'émission de fluorescence de H_2B a été mesuré à 440 nm.

1.3.3. Réaction de nitration :

Les échantillons ayant servi à la mesure de la réactivité d'oxydation à un électron en absence de CO_2 ont été analysés par HPLC afin de mettre en évidence la présence éventuelle de nitro-HPA (voir chapitre II, 3.1.3.). A pH acide, le signal de nitro-HPA est détecté à 280 et 365 nm. A 280 nm d'autres produits issus de l'oxydation de HPA par PN sont détectés. A 365 nm seul nitro-HPA absorbe. L'aire de pic correspondant au nitro-HPA a été calculée pour chaque échantillon. Les résultats sont présentés figure III.18 en fonction de la concentration de PN. Nous observons une évolution linéaire de la production de nitro-HPA en fonction de la concentration de PN ayant réagi. Cette activité est attribuée au PN puisque les échantillons témoins PN décomposé ne présentent aucun signal à 365 nm. En présence de iNOSoxy, l'activité de nitration du PN augmente de + 90 %. Cette réactivité est bien liée à l'activation du PN par iNOSoxy puisque aucune formation de nitro-HPA n'est observée pour les échantillons témoins « PN décomposé plus enzyme ». Ces résultats montrent que iNOSoxy favorise l'activité de nitration du PN et renforcent l'hypothèse suivant laquelle la réaction d'activation du PN par iNOSoxy passerait par la formation d'un complexe oxoferryl, $Fe^{IV}=O$.

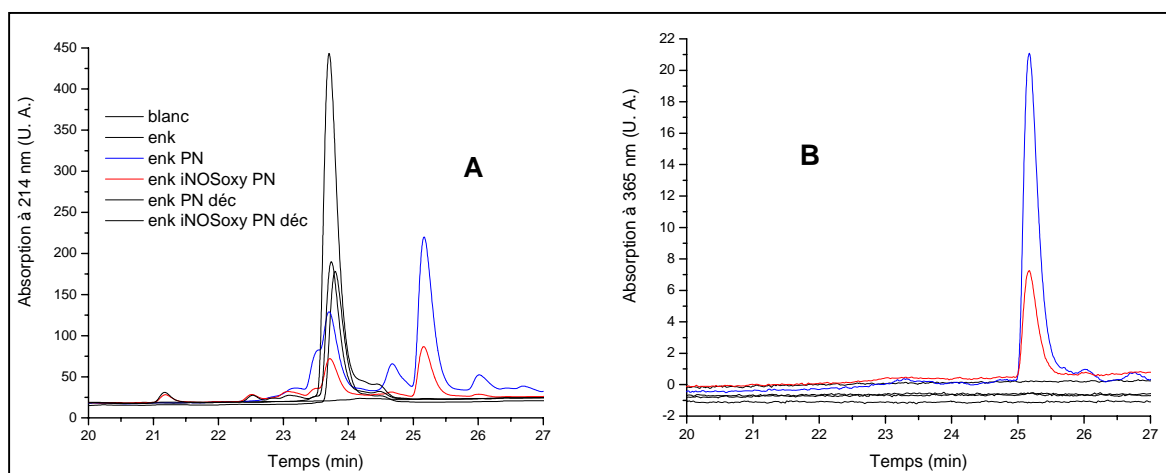


Figure III.19. Chromatogrammes de la L-enképhaline enregistrés à 214 nm (A) et à 365 nm (B) après réaction avec PN en absence (bleu) et en présence (rouge) de iNOSoxy. La L-enképhaline est observée à 23,8 min. Le pic à 25,2 min correspond à la L-enképhaline nitrée. Les produits de la réaction de la L-enképhaline avec des solutions de PN décomposé en absence et en présence de iNOSoxy ont également été analysés ; seul le pic caractéristique de la L-enképhaline est observé pour ces échantillons.

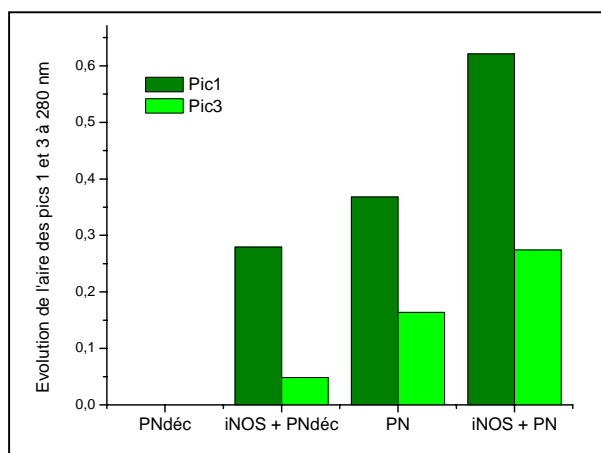


Figure III.20. Evolution observée de l'aire des pics 1 et 3, détectés à 280 nm en HPLC, en fonction de la concentration de PN lors de l'analyse des échantillons de HPA ayant réagi avec PN décomposé, iNOSoxy et PN décomposé, PN, iNOSoxy et PN.

HPA est une petite molécule. Nous avons voulu savoir si le système {iNOSoxy + PN} était capable de nitrer des résidus aromatiques portés par un petit peptide. La leucine-enképhaline (L-enképhaline) comporte 5 acides aminés et sa séquence est la suivante : Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu. En HPLC, son signal est détecté à 214 nm à T. R.= 23,7 min (fig. III.19). Les produits de réaction de 1 mM L-enképhaline avec 2 mM PN en conditions non anaérobies (présence de CO₂) sont analysés par HPLC. Le chromatogramme obtenu présente 4 nouveaux pics dont un à T. R.= 25,15 min qui est le seul à absorber à 365 nm. Une analyse en spectrométrie de masse confirme qu'il s'agit de la nitro-leucine-enképhaline (résultats non présentés). Les autres produits de réaction ne sont pas identifiés. La réaction est ensuite réalisée en présence de iNOSoxy, en conditions anaérobies, et l'analyse des produits par HPLC confirme la formation de nitro-L-enképhaline. Cette expérience est purement qualitative mais nous permet de démontrer que le système {iNOSoxy + PN} induit non seulement la nitration de petites molécules phénoliques (HPA) mais aussi de petits peptides tels que la L-enképhaline.

1.3.4. Autres réactions liées au PN :

La réactivité du PN n'est pas limitée aux réactions d'oxydation à un, deux électrons ou à la réaction de nitration. En effet, PN peut également réaliser des réactions de nitrosation (NO⁺) ou de nitrosylation (NO), et HPA est une cible potentielle pour chacune de ces réactions. Si nous reprenons les chromatogrammes enregistrés lors de l'analyse HPLC (voir 1.3.3.), nous avons observé un massif de pics à 280 nm. Le pic 2 au centre correspond au nitro-HPA mais les pics 1 et 3 n'ont pas été identifiés. Ils sont détectés pour tous les échantillons de PN, en absence et en présence de iNOSoxy, ainsi que pour les échantillons PN décomposé en présence de iNOSoxy. L'aire correspondant aux pics 1 et 3 évolue linéairement avec la concentration de PN. La figure III.20 représente cette évolution en fonction des conditions expérimentales. Même si ces composés n'ont pas été identifiés, il est intéressant d'observer que la présence de iNOSoxy augmente aussi leur production.

Enfin nous avons cherché à établir le rapport nitrites/nitrates issus de la décomposition du PN dans nos conditions expérimentales. Cet équilibre final peut apporter des éléments de réponse quant au type de décomposition du PN. En effet les processus radicalaires, soit l'activation du PN, favorisent la synthèse finale de nitrites. *A contrario* l'isomérisation du PN mène à la production de nitrates.

Le test de base est le test de la nitrate réductase (NR) avec détection des nitrites formés par le réactif de Griess (voir chapitre II, 3.1.4.2.). Ce test fonctionne très bien dans nos conditions expérimentales comme nous avons pu le constater lors de la construction des courbes

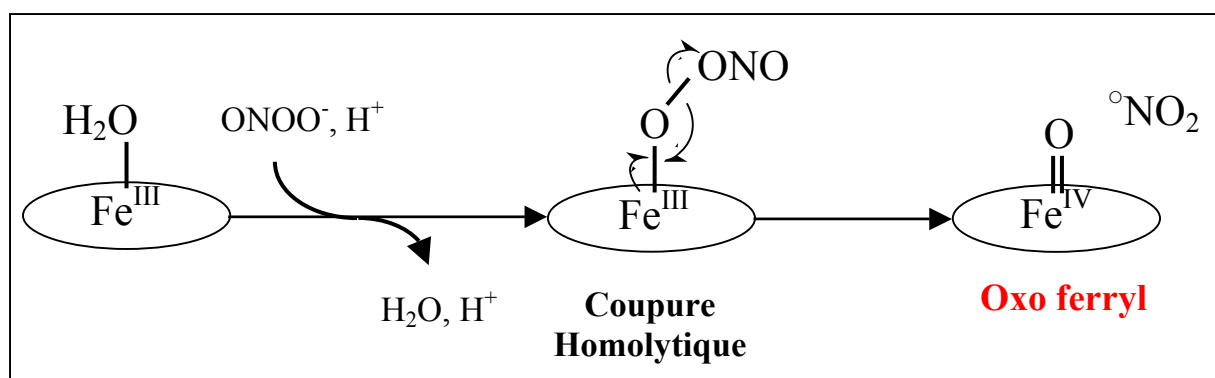


Figure III.21. Mécanisme proposé pour l'activation du peroxyntrite par l'isoforme inductible de NOS. La première étape correspondrait à la fixation du peroxyntrite avec déplacement de la molécule d'eau. La seconde étape consisterait en la rupture homolytique de la liaison O-O du PN, catalysée par le fer, pour former une paire oxoferryl - radical $\cdot\text{NO}_2$.

d'étalonnage nitrites, et nitrates ayant réagi avec NR. Elles sont parfaitement superposables. Après décomposition du PN à pH 7,4 en absence de CO₂, nous avons mesuré 43 % nitrites et 57 % nitrates. Ces résultats ne sont pas conformes à la littérature puisqu'on devrait obtenir 30 % nitrites et 70 % nitrates. La même expérience a été réalisée en présence de iNOSoxy. Aucune différence n'a été observée entre les deux échantillons. Une expérience simple pour valider ces résultats consiste à faire se décomposer PN dans des solutions KPi de valeurs de pH différentes, ou en présence de CO₂ dans le milieu. Dans toutes ces conditions expérimentales, nous avons mesuré le même rapport nitrites/nitrates. Ces résultats ne corrèlent pas avec la littérature, notamment pour les expériences de décomposition du PN à pH acide (<5) où nous devrions détecter 100 % nitrates [121].

Une analyse des produits de décomposition du PN en fonction du pH a été réalisée par la suite avec le kit Nitralyzer II de chez Biorad, mais l'utilisation de ce kit commercial n'a pas permis d'obtenir des résultats plus cohérents.

1.4. Discussion et perspectives :

Nous avons montré que iNOSoxy fixe PN et en active la décomposition avec une constante de vitesse d'ordre 2, mesurée à $21 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 7,4, en absence de CO₂. Ainsi dans le cas d'une production *in situ* de PN par iNOSoxy, après oxydation du complexe Fe^{II}-NO, nous suggérons que PN ne soit pas libéré dans le milieu extérieur mais pris en charge par l'enzyme. Cette activation du PN par iNOSoxy aurait pour effet d'augmenter la capacité du PN à réaliser des réactions radicalaires de type oxydation à un électron et nitration, sur des groupes aromatiques portés par des petites molécules ou des peptides.

Ce bilan de réactivité nous permet de proposer le passage par un intermédiaire oxoferryl (type composé II, Fe^{IV}=O) dans la réaction d'activation du PN par iNOSoxy, illustré figure III.21. Cet intermédiaire pourrait correspondre à l'espèce (I), observée lors des expériences de mélanges rapides, avec un maximum d'absorption à 442 nm, accompagné de deux bandes d'absorption secondaires à 549 et 588 nm. L'espèce (I) a été observée aux trois valeurs de pH étudiées, l'intensité de son signal étant d'autant plus importante que le pH de la réaction est acide.

L'étude des cinétiques d'activation du PN dans différentes conditions de milieu (pH, CO₂) et d'environnement de l'hème (substrat, co-facteur) a apporté différents éléments de compréhension du mécanisme. Par exemple, l'activation de la décomposition du PN est accélérée à pH acide ce qui suggère la réaction préférentielle de iNOSoxy avec l'acide

peroxynitreux, ONOOH, comme précédemment proposé pour d'autres hémoprotéines (myoglobine, hémoglobine, peroxydase). Ce comportement est contraire à celui des métalloporphyrines ce qui fait penser que la charge portée par PN puisse être défavorable à son accès au site actif des hémoprotéines.

La fixation du substrat arginine ou du produit citrulline inhibe l'activation du PN alors que la présence seule du co-facteur H₄B ne semble pas avoir d'impact sur sa cinétique de décomposition. Une augmentation du potentiel de l'hème due à la fixation du substrat (+112 mV) n'est pas un argument satisfaisant pour justifier la diminution de l'activation du PN par iNOSoxy puisque la présence du co-facteur H₄B induit le même effet (+84 mV). De même, l'hypothèse d'une gêne stérique par le substrat, empêchant l'accès du PN au site catalytique, semble compromise puisqu'en présence de substrat, l'activation du complexe NPC, plus encombrant que PN, n'est pas totalement inhibée. Sauf à imaginer que NPC ne réagit pas directement avec iNOSoxy mais plutôt les radicaux CO₃^{•-} ou [•]NO₂, plus petits, en équilibre rapide avec NPC [128].

La compétition au site actif entre peroxynitrite et substrats sera intéressante dans le cas de l'étude de la synthèse *in situ* du PN. En effet si le substrat empêche PN de se positionner au site actif pour être activé, il est fort probable qu'il exerce son influence sur les étapes qui suivent sa formation. Ainsi le substrat pourrait soit forcer l'inhibition de l'activation du PN par l'enzyme et permettre au PN de diffuser vers le milieu extérieur, soit forcer PN à rester au site catalytique pour être activé de manière plus efficace. Suivant cette dernière hypothèse, le système {iNOSoxy + PN} générant des espèces oxydantes et nitrantes, la gêne stérique induite par la présence du substrat pourrait conduire à l'inhibition de l'enzyme par modification de résidus clefs (cystéine, tyrosine, tryptophane).

Dans l'hypothèse d'une synthèse de PN *in situ*, soit au site actif de iNOSoxy, PN devrait être isolé du CO₂ du milieu. Cependant, dans l'hypothèse d'une production *ex situ* de PN (en conditions de stress oxydant générant des ions superoxyde à proximité du site de biosynthèse naturel de NO, par exemple par découplage de l'activité des NOSs) PN réagirait instantanément avec le CO₂ pour former l'anion nitrosoperoxy carbonate (NPC). Or iNOSoxy semble activer aussi bien PN que NPC, menant dans les deux cas PN à un seuil de toxicité maximum. Ainsi, en conditions de stress, tout porte à croire que iNOSoxy serait impliquée dans l'amplification des processus oxydants plutôt que dans leur détoxication, contrairement à ce qui a été proposé pour les globines [141].

Le spectre d'absorption calculé pour l'intermédiaire (I) présente les mêmes caractéristiques que celui du complexe Fe^{III}-NO de iNOSoxy (voir chapitre II, fig. II.9). L'équipe de M. T.

Green a récemment mis en évidence un intermédiaire semblable dans la réaction du cytochrome P450_{BM-3} avec PN [151]. Comme nous, les auteurs ont été frappés par la ressemblance entre les spectres d'absorption de cet intermédiaire et du complexe Fe^{III}-NO du cytochrome P450_{BM-3}. Ainsi ils ont caractérisé leur intermédiaire et le complexe Fe^{III}-NO du cytochrome P450_{BM-3} par spectroscopie Mössbauer. Pour l'intermédiaire de la réaction {P450_{BM-3} + PN} ils ont obtenus les paramètres Mössbauer $\delta = 0,15$ mm/s et $\Delta E_Q = 1,15$ mm/s et ont conclu qu'ils étaient comparables à ceux du complexe {Fe^{II}(NO⁺)} ($\delta = 0,09$ mm/s et $\Delta E_Q = 1,32$ mm/s). Cependant, il est étonnant de constater que sur la base de la ressemblance des spectres d'absorption UV-visible, les auteurs ont préférentiellement identifié l'intermédiaire à un complexe Fe^{III}-NO alors que les paramètres Mössbauer enregistrés correspondent tout aussi bien, voire mieux, à ceux d'un pur complexe oxoferryl Fe^{IV}=O, non protoné ($\delta = 0,11$ mm/s et $\Delta E_Q = 1,05$ mm/s). Néanmoins nous nous sommes tout de même demandé si il existait un chemin réactionnel qui pouvait mener à la formation d'un complexe Fe^{III}-NO au cours de la réaction de iNOSoxy avec PN.

La première hypothèse serait de considérer une dissociation de PN pour former les radicaux NO et O₂^{·-}. Or d'un point de vue cinétique, l'activation du PN par iNOSoxy est beaucoup plus rapide que la vitesse de dissociation du PN ainsi il semble peu probable que cette réaction puisse avoir lieu. Il faudrait alors considérer une première étape de fixation du PN au fer par l'azote ce qui semble également peu probable du fait de la localisation de la charge sur l'atome d'oxygène. De plus, ce mécanisme (Fe^{III}-N(O)OO → Fe^{III}-NO + O₂^{·-}) ne permet pas de rendre compte de l'activité de nitration observée, ce qui nous amène à rejeter cette hypothèse.

Puisque toutes nos expériences ont été réalisées en condition d'excès de PN par rapport à l'enzyme (x 10 à 100), la seconde hypothèse serait de considérer un mécanisme type métalloporphyrine à fer (voir 1.1.2.1.) [138]. PN serait alors majoritairement activé par un composé oxoferryl Fe^{IV}=O, plutôt que par l'enzyme native Fe^{III}, pour former un composé oxoferryl-radical cation Fe^{IV}=O^{·+}. Ce composé pourrait alors oxyder une molécule de nitrite et former le système capable de nitration : {Fe^{IV}=O + ·NO₂}. Cependant pour qu'une telle réaction soit permise, il faudrait considérer une large contamination de nos solutions de PN avec des nitrites, ce qui est peu probable. Ainsi le composé oxoferryl-radical cation réagirait plutôt avec une autre molécule de PN, pour former le radical nitrosoperoxy (ONOO[·]), très instable, qui se décomposerait en dioxygène et NO. Un tel mécanisme a été proposé pour la réaction du PN avec la microperoxydase MP11 et les cytochromes P450_{NOR} et P450_{BM-3}

[145]. J. P. Crow et C. Reiter n'ayant pas observé de dégagement de NO gaz lors de l'étude des métalloporphyrines à fer avec PN, il a été postulé que le NO formé puisse être immédiatement consommé, soit par recombinaison avec d'autres radicaux ($\cdot\text{NO}_2$), soit par oxydation par l'oxoferryl pour former un complexe $\{\text{Fe}^{\text{III}}(\text{NO}^{\cdot})\}$ [152]. Cependant, dans le cas des NOSs, un tel complexe évoluerait rapidement par recombinaison géminée vers un complexe $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}]$ qui 1) n'est pas observé dans nos conditions expérimentales, et 2) ne correspond pas à un complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}]$. Ainsi il semble que ce mécanisme ne permette pas non plus d'orienter la réaction vers la formation d'un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$.

Nous discuterons à nouveau cette dernière hypothèse mécanistique, ainsi que la nature de l'intermédiaire (I), lors de l'étude de l'activation du PN par iNOSoxy en condition stoechiométrique de concentrations (voir 2.5.).

L'ensemble de nos résultats supporte la formation d'un intermédiaire oxoferryl $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$, et nous proposons qu'il puisse correspondre à l'espèce (I) observée lors de la réaction de mélange rapide entre PN et iNOSoxy. Ainsi nous proposons à présent de développer une étude du mécanisme de cette réaction, en attachant une attention particulière aux conditions de formation de l'intermédiaire (I).

2. Investigations mécanistiques :

Lors de l'étude cinétique de décomposition du PN en présence de iNOSoxy, la formation d'un intermédiaire (I) a été observée (voir 1.2.1.2.). Nous avons suggéré qu'il puisse s'agir d'un complexe de type composé II, $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$. Une étude des conditions de formation, et plus généralement d'observation, de cette espèce pourrait apporter des informations supplémentaires pour appuyer et enrichir le schéma réactionnel proposé précédemment (voir 1.4.).

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude cinétique de la vitesse de formation de l'intermédiaire (I) en fonction de deux paramètres : la concentration de PN, et la valeur du pH à laquelle est menée la réaction. Ensuite, nous avons analysé les transitions du spectre d'absorption de l'enzyme au cours de sa réaction avec PN à deux valeurs extrêmes de pH, 6,4 et 8,4, ce qui nous a permis de mettre en évidence l'existence d'autres espèces, en amont de l'intermédiaire (I). Ensemble, ces résultats nous ont permis de proposer un nouveau modèle pour l'activation de PN par iNOSoxy. Enfin, toutes les expériences ayant été menées jusqu'ici en condition d'excès de PN par rapport à l'enzyme, nous avons étudié les transitions du spectre d'absorption de iNOSoxy lors de l'activation d'un équivalent stoechiométrique de PN à différentes valeurs de pH.

2.1. Etude cinétique de l'intermédiaire (I) en fonction de la concentration de PN et du pH :

Le modèle simple précédemment proposé pour la réaction de iNOSoxy avec PN est constitué de deux étapes (voir 1.4., fig. III.21). La première étape consisterait en la fixation du PN à l'hème. Elle serait suivie d'une deuxième étape de rupture homolytique de la liaison O-O du PN qui générerait un complexe oxoferryl et un radical $\cdot\text{NO}_2$, ensemble responsables de l'activité de nitration. Lors de l'analyse des expériences de mélanges rapides, nous avons observé que le rapport de concentrations entre PN et iNOSoxy, ainsi que la valeur du pH de la réaction, sont des paramètres qui influencent la formation de l'intermédiaire (I). Une étude cinétique de la formation de l'intermédiaire (I) a donc été menée pour tenter de comprendre comment ces paramètres ($[\text{PN}]$, pH) pouvaient intervenir dans le mécanisme.

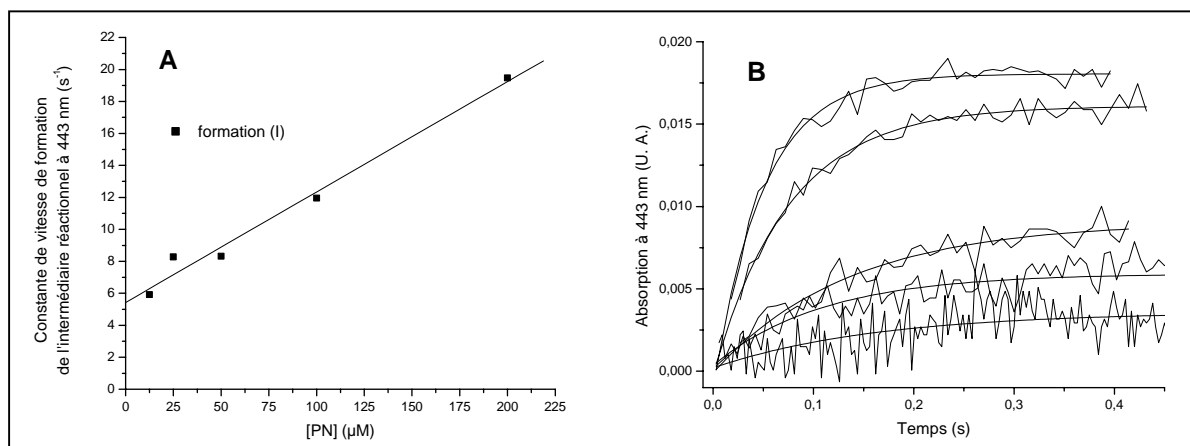


Figure III.22. A. Représentation graphique de l'évolution des constantes de vitesse observées pour la formation de l'intermédiaire à 443 nm, lors de la réaction du PN avec iNOSoxy dans KPi 0,1 M pH 7,4 ($-CO_2$), en fonction de la concentration en PN. B. Traces cinétiques enregistrées à 443 nm au cours des 450 premières ms de la réaction témoignant de la formation de l'intermédiaire.

2.1.1. [PN] :

La réaction en mélange rapide de iNOSoxy (1,5 μM) avec des concentrations croissantes de PN allant de 12,5 à 200 μM a été réalisée à pH 7,4 et en absence de CO_2 . Pour chaque expérience le spectre de l'intermédiaire (I) a été calculé. Sa signature spectrale en absorption ne varie pas avec la concentration de PN. Il présente toujours un maximum à 443 nm et deux bandes d'absorption secondaires à 548 et 588 nm. Les traces cinétiques enregistrées à 443 nm, correspondant à la formation de l'intermédiaire (I), sont présentées figure III.22-B. Plus la concentration de PN est importante, plus l'amplitude du signal est grande. La vitesse de formation de l'intermédiaire a été calculée par modélisation mono-exponentielle des traces cinétiques. Les constantes de vitesse observées ont été représentées en fonction de la concentration en PN. La figure III.22-A présente les résultats. La constante de vitesse de formation de l'intermédiaire (I) évolue linéairement avec la concentration de PN, ce qui suggère une réaction d'ordre 2. D'après l'analyse cinétique proposée par R. Floris pour la réaction de la myéloperoxydase avec PN [140], la constante de vitesse de pseudo-premier ordre devrait suivre la loi suivante :

$$k_{obs} = k_{app} \times [PN] + b .$$

Ainsi dans nos conditions expérimentales, la constante de vitesse de second ordre (k_{app}) est déterminée à $6,91 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\pm 0,52 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) pour la formation de l'intermédiaire (I) à pH 7,4. Cette analyse cinétique indique que la fixation du PN à l'hème, première étape de la réaction de iNOSoxy avec PN, semble contrôler la cinétique de formation de (I).

Les réactions ont toutes été réalisées en excès de PN par rapport à l'enzyme. L'observation de (I) devrait donc correspondre à un état stationnaire de la réaction entre iNOSoxy et PN. Par ailleurs la disparition de (I) ne peut être assimilée à une simple phase d'épuisement puisqu'elle a lieu alors que PN n'est pas totalement décomposé. Cependant, nos résultats indiquent qu'il ne s'agit pas d'une phase où l'intermédiaire (I) réagit de manière stoechiométrique avec PN. En effet dans ces conditions, la disparition de l'absorption de l'intermédiaire devrait s'amorcer à une même concentration de PN, ce qui n'est pas le cas (résultats non présentés). Néanmoins en première approximation, la cinétique de disparition de l'intermédiaire (I) a été modélisée par une fonction mono-exponentielle. Les constantes de vitesse obtenues semblent être indépendantes de la concentration de PN et ont été déterminées autour de $0,47 \text{ s}^{-1}$ ($\pm 0,06 \text{ s}^{-1}$). Pour comparaison, cette valeur est proche, bien que 5 fois plus rapide, de celle déterminée par A. Daiber lors de la réaction du cytochrome P450_{BM-3} avec PN [144].

pH	Soret (nm)
6,22	439,5
6,40	441
6,58	442,5
6,87	442,8
7,02	443,5
7,21	444
7,42	444
7,61	445
7,88	445,2
8,05	446
8,40	446

Table III.6. Longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la bande de Soret de l'intermédiaire lors de la réaction de 100 μM PN avec 4 μM iNOSoxy dans KPi 0,1 M ($-\text{CO}_2$) en fonction de la valeur du pH. Le spectre de l'intermédiaire a été calculé dans chaque cas par soustraction de la contribution du spectre d'absorption enregistré après 6 ms de réaction.

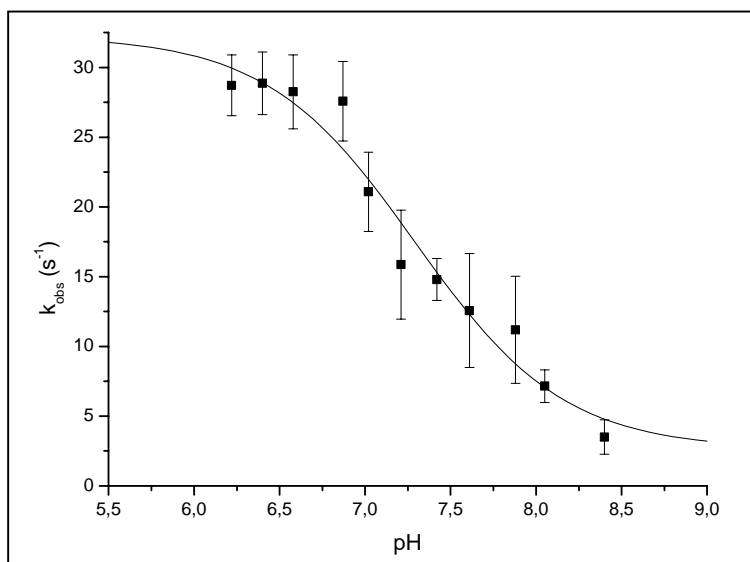


Figure III.23. Représentation graphique de l'évolution des constantes de vitesse observées pour la formation de l'intermédiaire à 443 nm, lors de la réaction de 100 μM PN avec iNOSoxy (1,5 μM) dans KPi 0,1 M pH 7,4 ($-\text{CO}_2$), en fonction de la valeur du pH. Les résultats ont été modélisés par une équation mettant en jeu l'intervention d'un couple acide/base ($\text{pK}_a = 7,29 \pm 0,14$) dans la formation de (I) ($k_{\text{acide}} = (32,3 \pm 1,8) \text{ s}^{-1}$ et $k_{\text{base}} = (2,6 \pm 2,1) \text{ s}^{-1}$).

Ainsi ces résultats apportent un argument d'ordre cinétique pour expliquer l'augmentation de l'amplitude du signal de l'intermédiaire avec la concentration de PN. En effet, plus le rapport de concentration entre PN et iNOSoxy est élevé, plus la formation de l'intermédiaire (I) est rapide. Puisque sa vitesse de disparition semble être indépendante de la concentration de PN, il est attendu qu'un grand rapport de concentration entre PN et iNOSoxy favorise l'observation de cette espèce.

2.1.2. pH :

Les constantes cinétiques de formation de l'intermédiaire (I) ont également été déterminées en fonction de la valeur du pH de la réaction. Pour cela une série d'expériences de mélanges rapides entre PN (100 μ M) et iNOSoxy (4 μ M) a été réalisée dans KPi 0,1 M, en absence de CO₂, sur une gamme de pH allant de 6,2 à 8,4. Le spectre de l'intermédiaire (I) a été calculé pour chaque condition de pH pour vérifier la position du maximum d'absorption de la bande de Soret. La signature spectrale de l'intermédiaire présente toujours les mêmes caractéristiques. Son maximum d'absorption se situe autour de 444 nm et est accompagné de deux bandes d'absorption secondaires à 548 et 588 nm.

Cependant, il semble que le maximum d'absorption se déplace légèrement avec la valeur du pH (2 à 3 nm par unité de pH). En effet, à pH 8,4 la bande de Soret absorbe à 446 nm alors qu'à pH 6,2 elle apparaît vers 440 nm. Une erreur de 1 ou 2 nm peut intervenir dans le calcul du spectre d'absorption de l'intermédiaire (I), en fonction de la proportion du spectre initial retirée. Néanmoins cette erreur ne semble pas assez significative pour justifier le déplacement du maximum d'absorption observé. Par ailleurs, ce comportement irait dans le sens d'une protonation du ligand porté par notre intermédiaire. En effet, lors de l'étude de la réaction de différentes protéines à centre hémothiolate avec des peracides (ROOH), M. T. Green a suggéré le passage par un intermédiaire oxoferryl protoné [Fe^{IV}-OH] [153-156].

La table III.6 rapporte la valeur de la longueur d'onde attribuée au maximum d'absorption de l'intermédiaire pour chaque valeur de pH testée. Les traces cinétiques de formation de l'intermédiaire (I) à cette longueur d'onde sont extraites pour chaque expérience et modélisées par une fonction mono-exponentielle. Les constantes de vitesse calculées sont représentées figure III.23 en fonction de la valeur du pH à laquelle a été menée la réaction. La constante de vitesse de formation de l'intermédiaire (I) évolue en fonction de la valeur du pH. Elle est d'autant plus rapide que le pH de la solution est acide, atteignant une valeur plateau pour les réactions menées aux pHs les plus acides (pH < 7).

Comme précédemment observé lors de l'étude cinétique en fonction de la concentration de PN (voir 2.1.1.), la vitesse de disparition de l'intermédiaire (I) reste là encore sur une échelle de temps beaucoup plus lente que sa formation, et évolue peu avec la valeur du pH. Ainsi nous disposons du même argument cinétique pour expliquer l'augmentation d'amplitude observée pour le signal de l'intermédiaire (I) avec l'acidité du milieu.

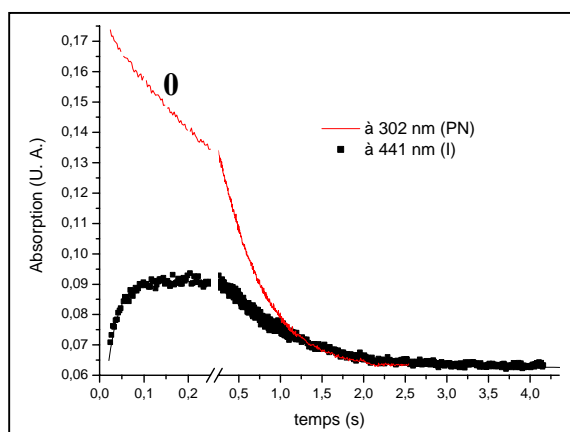
Si un seul groupe acide/base induit la dépendance en pH observée, la constante de vitesse de formation de (I), devrait suivre la relation suivante :

$$k_{obs} = \frac{k_{HA} \times [H^+] + k_{A^-} \times K_{HA}}{K_{HA} + [H^+]}$$

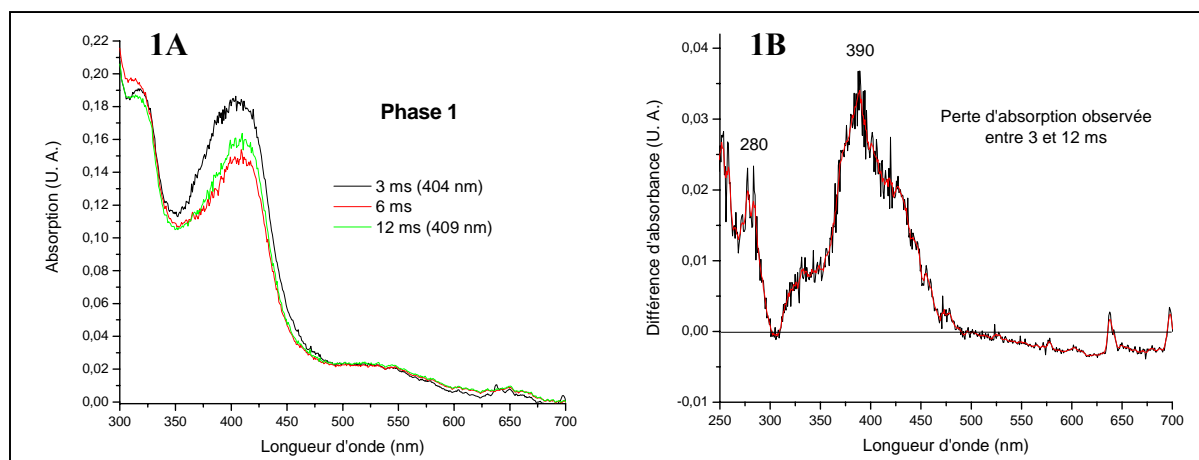
avec k_{HA} et k_{A^-} , les constantes de vitesse de réaction lorsque le groupe est sous sa forme protonée ou déprotonée, et K_{HA} , la constante de dissociation du groupe protonable (voir annexe 5.1. pour le détail de l'élaboration de l'équation). La modélisation de nos résultats par cette équation (fig. III.23), est relativement satisfaisante, bien que le nombre de points soit insuffisant pour permettre de conclure sur une si faible gamme de pH. Elle donne $k_{HA} = (32,3 \pm 1,8) \text{ s}^{-1}$, $k_{A^-} = (2,6 \pm 2,1) \text{ s}^{-1}$ et un pKa de 7,29 ($\pm 0,14$) pour le couple acide/base impliqué dans la réaction de formation de (I). Ce pKa est proche de celui du PN (pKa = 6,8). Ainsi nous proposons que le couple acide/base formé par PNH/PN puisse être responsable de la dépendance en pH de la réaction de formation de (I), comme dans le cas de la réaction du PN avec la myéloperoxydase et la peroxydase de raifort (HRP) [140].

Cette hypothèse suggère que l'intermédiaire (I) soit formé préférentiellement à partir de PNH, c'est-à-dire à partir d'un complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}]$. Or, *a priori*, il n'y a pas de raison de négliger la possible protonation du PN une fois fixé à l'hème. Nous proposons à présent une analyse des transitions du spectre d'absorption de iNOSoxy au cours de la réaction avec PN à deux valeurs extrêmes de pH, ce qui nous amènera à proposer un mécanisme plus complet pour la formation de (I), impliquant la protonation du PN fixé au fer de l'hème et donc une double dépendance en pH.

Figure III.24. Analyse détaillée des différentes phases observées au cours de l'activation de 100 μ M PN par 4 μ M iNOSoxy dans KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA à pH 6,4 ($-\text{CO}_2$).



0. Superposition des traces cinétiques enregistrées à 302 nm (PN) et 441 nm (I).



1. Première phase de la réaction. A) Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 3, 6 et 12 ms de réaction. B) Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 12 ms à celui enregistré à 3 ms ; la différence positive d'absorption correspond à l'absorption perdue entre 3 et 12 ms de réaction.

2.2. Analyse de la réaction d'activation d'un excès de PN par iNOSoxy à différentes valeurs de pH :

2.2.1. A pH 6,4 :

A pH 6,4 et en absence de CO₂, la réaction de décomposition de 100 μM PN en présence de 4 μM iNOSoxy est rapide et totalement achevée en 3 s. Globalement, les transitions observées correspondent à la formation (3 - 200 ms), suivie de la disparition (0,24 - 4,35 s), de l'intermédiaire (I) précédemment décrit, dont le maximum d'absorption se situe à 441 nm (fig. III.24-0). Une analyse détaillée de l'évolution des spectres d'absorption enregistrés au cours du temps nous permet de mettre en évidence l'existence d'autres espèces au cours de la réaction. La figure III.24 présente le détail de cette analyse.

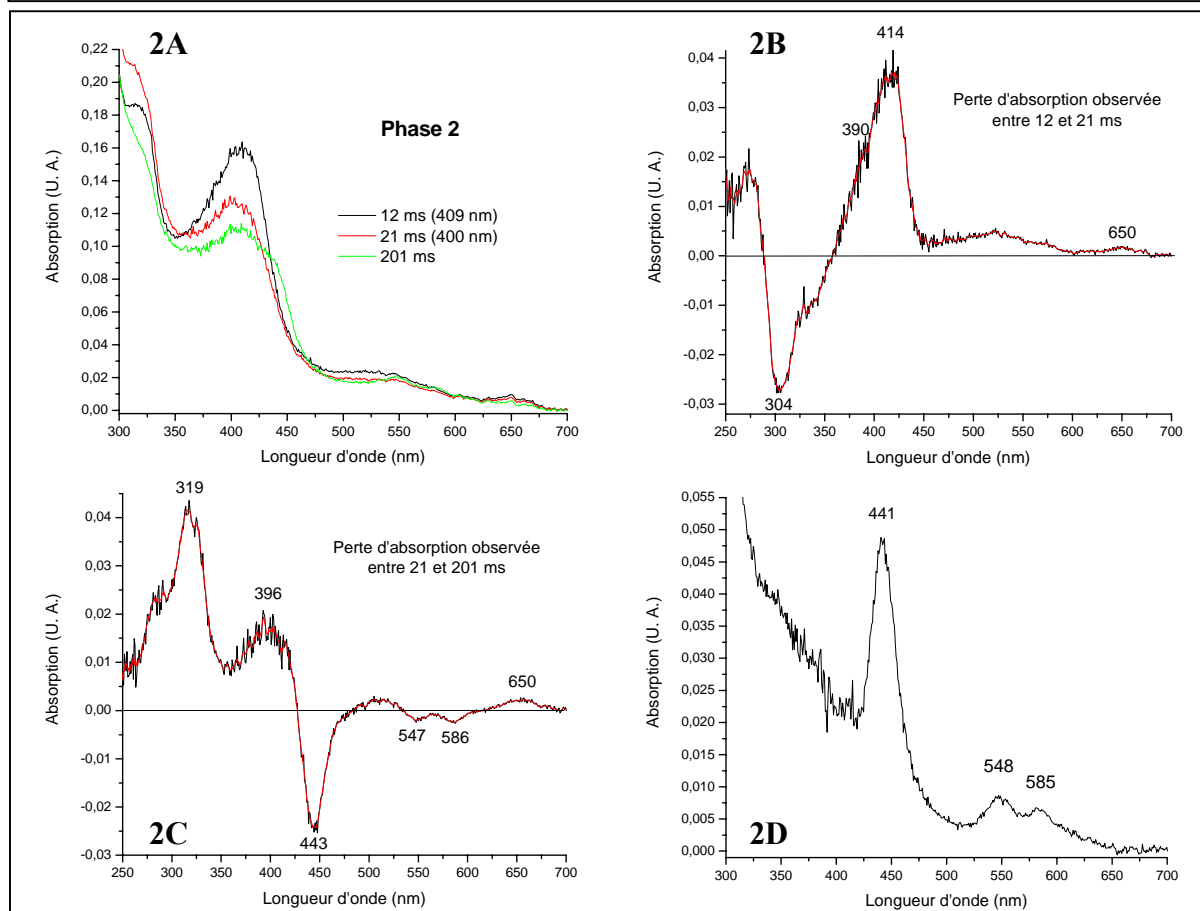
2.2.1.1. Description des trois phases de la réaction :

Première phase : figure III.24-1. Le premier spectre d'absorption enregistré à 3 ms pour iNOSoxy présente une bande d'absorption large centrée à 404 nm (fig. III.24-1A). A cette valeur de pH, la bande de Soret caractéristique de l'enzyme native en absence de substrat et de co-facteur (Fe^{III} BS 6 coordiné) devrait se situer à 419 nm. Il ne s'agit donc pas du spectre d'absorption de iNOSoxy native, ce qui suggère que la réaction de fixation de PN n'est pas résolue en temps avec notre dispositif de mélange rapide. Par ailleurs, la largeur de la bande d'absorption principale suggère la présence de plusieurs espèces. Dans les 12 premières ms cette bande s'affine et se déplace de 404 à 409 ms.

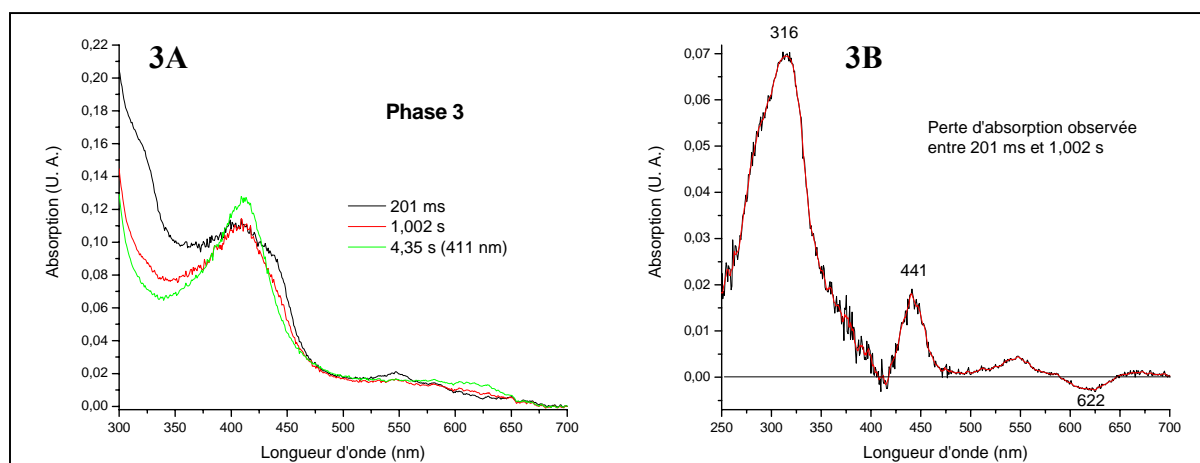
Deuxième phase : figure III.24-2. Elle se découpe en deux étapes. Entre 12 et 21 ms, il semble que le mélange d'espèces continue d'évoluer comme en témoigne le déplacement de la bande d'absorption principale de 409 à 400 nm (fig. III.24-2A). Entre 21 et 201 ms, la formation de l'intermédiaire (I) prédomine et un épaulement apparaît sur les spectres entre 440 et 445 nm. Tout au long de cette deuxième phase nous observons une diminution de l'absorption à 650 nm.

Troisième phase : figure III.24-3. Elle correspond à l'épuisement de l'absorption de l'intermédiaire (I), jusqu'à sa totale disparition (fig. III.24-3A). Le dernier spectre d'absorption, enregistré à 4,35 s, présente une bande de Soret à 411 nm et une nouvelle bande d'absorption à 624 nm. Ce spectre final d'absorption ne correspond pas à un état de coordination natif de l'hème. La réaction semble donc conduire à la formation d'une espèce iNOSoxy modifiée.

Figure III.24. Analyse détaillée des différentes phases observées au cours de l'activation de 100 μ M PN par 4 μ M iNOSoxy dans KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA à pH 6,4 ($-\text{CO}_2$).



2. Deuxième phase de la réaction. A) Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 12, 21 et 201 ms de réaction. B) Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 21 ms à celui enregistré à 12 ms. C) Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 201 ms à celui enregistré à 21 ms. D) Spectre d'absorption calculé pour l'intermédiaire (I) à $t = 180$ ms, par soustraction de 60 % du spectre enregistré à 6 ms, le spectre initial étant trop déformé.



3. Troisième phase de la réaction. A) Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 0,201, 1,002 et 4,35 s de réaction. B) Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 1,002 s à celui enregistré à 0,201 s.

2.2.1.2. Présentation d'un nouveau modèle réactionnel :

Différentes opérations de soustraction de spectres ont été effectuées pour mettre en évidence la perte d'absorption observée au cours de chaque étape de la réaction. Ces résultats nous permettent de proposer un modèle réactionnel simple pour l'activation du PN par iNOSoxy, présenté figure III.25.

Nous proposons la co-existence de quatre espèces au cours de la réaction qui absorberaient autour de 390 nm (E1, fig. III.24-1B-2B-2C), 411 nm (E2, fig. III.24-2B), 419 nm (iNOSoxy native) et 441 nm (I). Pour rendre compte des variations d'amplitude du signal d'absorption observées au cours de la réaction, nous suggérons que tous ces complexes de iNOSoxy aient des coefficients d'extinction molaire différents.

Dès 3 ms, PN (ONOO⁻), PNH (ONOOH) et iNOSoxy interagissent. Ensemble ils formeraient un mélange d'espèces dont les proportions relatives évolueraient au cours des phases 1 et 2, expliquant ainsi les déplacements du maximum d'absorption entre 400 et 409 nm. Ainsi au cours de la phase 1, (E1) disparaîtrait, tandis que (E2) se stabiliserait ou se formerait au détriment de iNOSoxy native. Les espèces (E1) et (E2), majoritaires, pourraient alors correspondre à des complexes {enzyme-PNH} et {enzyme-PN} formés instantanément, soit $[\text{Fe}^{\text{III}} - \text{O}(\text{H})\text{ONO}]$ et $[\text{Fe}^{\text{III}} - \text{OONO}]$ respectivement.

La deuxième phase de la réaction semble correspondre à une accumulation de l'espèce (E1) au détriment de (E2), et éventuellement de iNOSoxy native (fig. III.24-2C). Ainsi nous proposons que l'espèce (E1) puisse être formée de deux façons : 1) par fixation de PNH à iNOSoxy native ; 2) par protonation de PN une fois fixé à l'hème (soit de E2). Ce n'est qu'après accumulation de (E1) qu'est observée significativement la formation de l'intermédiaire (I), ce qui suggère que seule (E1) permette sa formation.

Ainsi la formation de l'intermédiaire (I) impliquerait la fixation à l'hème de l'acide peroxylnitieux (PNH), plutôt que du peroxylnitrite (PN). Nous suggérons alors que la présence d'un proton puisse assister le métal dans la rupture homolytique de la liaison O-O. De plus nous proposons que le complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}]$ puisse également être formé par protonation du PN *in situ*, c'est-à-dire une fois fixé au fer de l'hème. Ainsi deux chemins distincts pourraient conduire à la formation de l'intermédiaire (I). Ce nouveau modèle réactionnel (fig. III.25) est en accord avec les transitions spectrales observées pour iNOSoxy au cours de l'activation du PN.

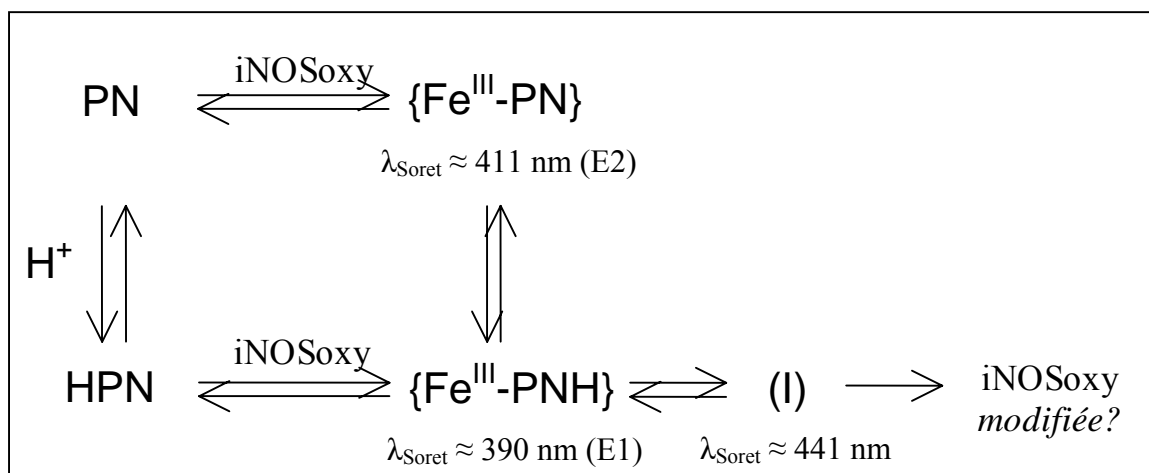


Figure III.25. Modèle simple illustrant l'évolution des spectres d'absorption enregistrés lors de l'analyse détaillée de la réaction entre PN et iNOSoxy en absence de CO_2 . L'enzyme serait à même de fixer PN et sa forme protonée PNH, mais seule la formation de ce dernier état lié conduirait à l'intermédiaire (I). La protonation du PN une fois fixé à l'hème permettrait également la formation de l'état lié actif $\{\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}\}$. Sont reportées sur le modèle les longueurs d'onde attribuées au maximum d'absorption des différents complexes enzymatiques. La réaction aboutirait à la formation d'une espèce finale iNOSoxy modifiée avec un maximum d'absorption plus ou moins déplacé vers le bleu et l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption à 624 nm.

2.2.1.3. Autres observations :

Cette analyse détaillée a permis d'autres observations, non reportées dans le modèle réactionnel présenté précédemment (fig. III.25).

Tout d'abord, la disparition des espèces (E), observée au cours de la formation de (I), est accompagnée de la disparition de l'absorption à 650 nm (fig. III.24-2). Or c'est précisément à cette longueur d'onde qu'absorbe la bande du transfert de charge des espèces Fe^{III} Haut Spin de NOS, ce qui suggère que les espèces (E) soient de type HS.

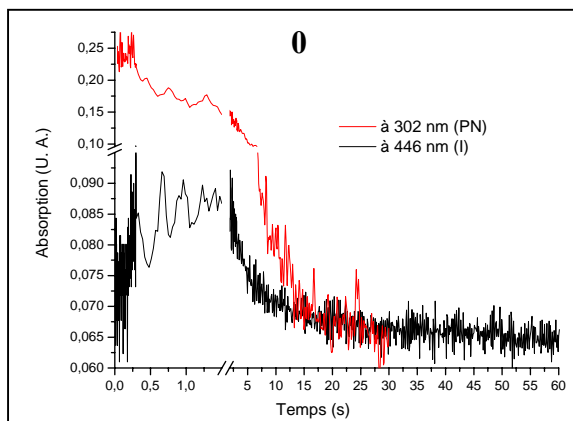
Ensuite, le spectre initial enregistré après 3 ms de réaction (fig. III.24-1A) comporte une bande d'absorption fine à 318 nm. Cette absorption n'est pas caractéristique de iNOSoxy et n'a jamais été observée dans d'autres expériences au laboratoire. Il ne s'agit pas du PN qui absorbe à 302 nm, ni de PNH qui absorbe à 240 nm [132]. Il semble cependant qu'elle contribue à la réaction. En effet, pendant les 21 premières ms de la réaction, soit principalement pendant les phases de réarrangement entre les espèces (E2) et (E1), l'absorption à 318 nm augmente (fig. III.24-1A-2A). Ensuite, dès que la formation de l'espèce (I) devient prépondérante sur les autres phénomènes, la disparition significative de l'absorption à 318 nm s'amorce. Elle ne sera totale qu'à la fin de la troisième phase, une fois l'intermédiaire (I) disparu (fig. III.24-2A-3A). Ainsi il semble qu'il y ait un lien entre cette absorption à 318 nm et l'intermédiaire (I), mais nous ne disposons pas d'éléments suffisants pour l'expliquer. Nous suggérons cependant qu'il puisse s'agir d'un résidu modifié de la protéine, sensible au PN et proche du site actif. Par exemple, la formation de radicaux tryptophane, neutres ou cationiques, engendre une bande d'absorption autour de 325 nm [157].

L'étude des transitions du spectre de iNOSoxy, lors de sa réaction avec PN à pH 6,4, nous a permis de proposer un nouveau modèle pour la formation de l'intermédiaire (I), présenté figure III.25. Voyons à présent si ce modèle rend compte des transitions spectrales observées pour l'enzyme lorsque la réaction est menée à pH alcalin.

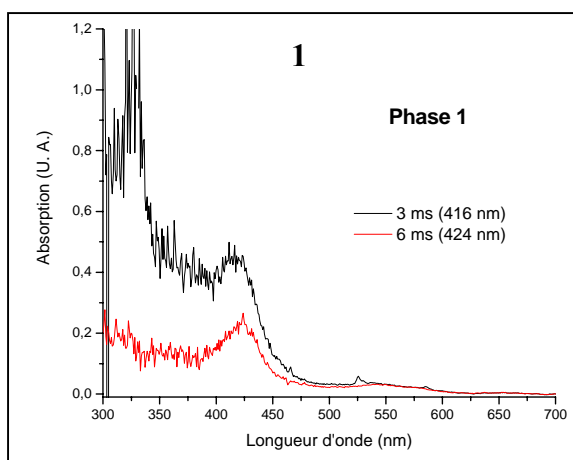
2.2.2. A pH 8,4 :

A pH 8,4, et toujours en absence de CO_2 , la réaction de décomposition du PN (100 μM) en présence de iNOSoxy (4 μM) est beaucoup plus lente qu'à pH 6,4 puisqu'elle n'est totalement achevée qu'après 30 s. Cependant, les mêmes transitions du spectre d'absorption de l'enzyme sont globalement observées et correspondent là encore à la formation (3 ms - 1,5 s) suivie de la disparition (1,5 - 60 s) de l'intermédiaire (I). Comme nous l'avons précédemment observé

Figure III.26. Phases observées au cours de l'activation du PN par iNOSoxy dans KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA à pH 8,4 (-CO₂).



0. Superposition des traces cinétiques enregistrées à 302 nm (PN) et 446 nm (I).



1. Première phase de la réaction. Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 3 et 6 ms de réaction.

(voir 2.1.2.), la cinétique de formation de l'intermédiaire (I) est également beaucoup plus lente puisqu'elle a lieu sur 1,5 s contre seulement 200 ms à pH 6,4 (fig. III.26-0).

2.2.2.1. Description des trois phases de la réaction :

La résolution des spectres d'absorption ne permet pas une analyse aussi fine que celle réalisée à pH 6,4. Cependant, les trois mêmes phases sont observées pour la réaction, ce qui semble renforcer le modèle réactionnel que nous avons proposé (fig. III.25). La figure III.26 présente cette analyse détaillée.

Première phase : figure III.26-1. Le premier spectre d'absorption enregistré à 3 ms présente une bande large centrée à 416 nm. Il ne correspond pas à iNOSoxy native puisque son absorption se situe autour de 423 nm à cette valeur de pH. 3 ms plus tard, l'intensité de la bande de Soret est divisée par deux et son maximum d'absorption est centré à 424 nm.

Deuxième phase : figure III.26-2. La seconde phase de la réaction, entre 6 ms et 1,5 s, correspond majoritairement à la formation de l'intermédiaire (I). A cette valeur de pH, l'intensité de son signal est très faible et aucun épaulement n'apparaît autour de 445 nm sur les spectres d'absorption (fig. III.26-2A). Seules l'extraction de la trace cinétique à 446 nm (fig. III.26-0) et une opération de soustraction de spectres (fig. III.26-2B) nous permettent de mettre en évidence son existence.

Troisième phase : figure III.26-3. Elle correspond à l'épuisement de l'absorption de l'intermédiaire (I) entre 1,5 et 61,05 s. Sur le dernier spectre d'absorption enregistré, la bande de Soret de iNOSoxy se situe à 423 nm, conformément à iNOSoxy native. Cependant l'apparition de la bande d'absorption à 624 nm suggère là encore la formation d'une espèce iNOSoxy finale dont la coordination native a été modifiée.

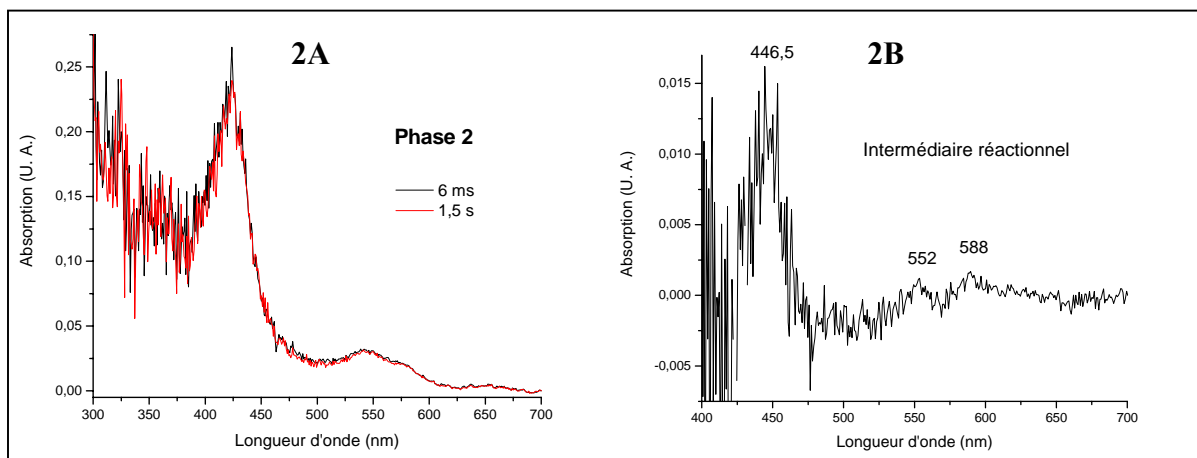
Enfin, comme observé lors de l'étude à pH 6,4, il semble qu'une absorption à 325 nm contribue à la réaction. Elle apparaît très intense sur le premier spectre enregistré (à 3 ms) et perd 80 % de son intensité après 6 ms de réaction (fig. III.26-1). Au cours de la phase de formation de l'intermédiaire (I) elle ne semble pas évoluer (deuxième phase, fig. III.26-2), et disparaît totalement au cours de la troisième phase de la réaction (fig. III.26-3).

2.2.2.2. Validation du modèle réactionnel et ouverture :

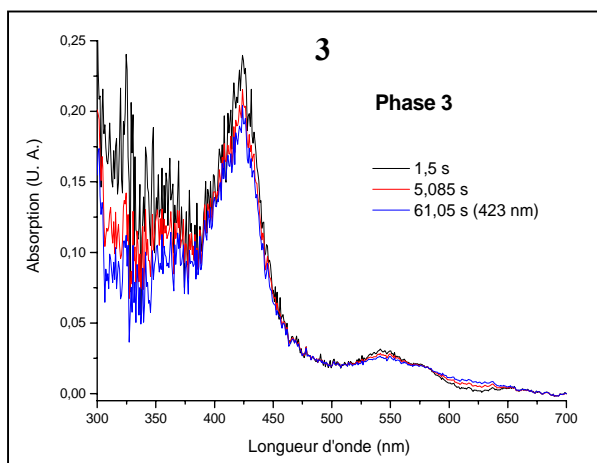
Toutes ces observations semblent corroborer notre modèle réactionnel.

En effet, à pH 8,4, PN prédomine sur PNH en solution ($pK_a = 6,8$). Il est donc attendu que dans le mélange d'espèces initial, observé dès 3 ms, le complexe $[Fe^{III}\text{-PN}]$ soit majoritaire

Figure III.26. Phases observées au cours de l'activation du PN par iNOSoxy dans KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA à pH 8,4 (-CO₂).



2. Deuxième phase de la réaction. A) Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 6 ms et 1,5 s de réaction. B) Spectre d'absorption calculé pour l'intermédiaire (I) à $t = 810$ ms, par soustraction de 90 % du spectre enregistré à 6 ms, le spectre initial étant trop déformé.



3. Troisième phase de la réaction. Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 1,5, 5,085 et 61,05 s de réaction.

sur le complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}]$. Ainsi l'observation d'un maximum d'absorption centré à 416 nm (contre 404 nm à pH 6,4) irait en faveur de l'attribution proposée pour les absorptions de ces deux complexes, autour de 411 et 390 nm respectivement. Cette hypothèse est par ailleurs en accord avec les travaux de S. Herold sur l'étude de la réaction entre la myoglobine et PN. Elle avait observé par expérience de mélange rapide la formation d'un complexe absorbant à 410 nm, et comme nous le proposons aujourd'hui, avait attribué ce signal au complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PN}]$ [158].

Si à pH 8,4 PN est prépondérant sur PNH, la conversion de (E2) en (E1), soit la protonation du PN une fois fixé au fer de l'hème, pour ensuite former (I), devrait également être plus difficile. D'autant plus que, théoriquement, la fixation du PN au fer devrait avoir pour effet d'abaisser légèrement son pKa. Ceci irait en faveur d'une plus faible proportion d'intermédiaire (I) formée à pH alcalin, suivant une vitesse de formation plus lente, et donc d'une vitesse globale de décomposition du PN par l'enzyme plus lente (voir 1.2.2.).

Dans chaque cas l'espèce finale observée ne correspond pas à iNOSoxy native. Il semble donc que la réaction modifie la coordination au site actif, faisant apparaître une nouvelle bande d'absorption à 624 nm. Cependant il est intéressant de remarquer qu'à pH 6,4 l'absorption de la bande de Soret de l'espèce finale est déplacée à 411 nm alors qu'à pH 8,4 il semble qu'elle reste à 423 nm. Ceci est peut être lié à la faible proportion d'intermédiaire (I) formée à pH 8,4. En effet, lors de l'étude de la réaction du PN avec la myoglobine et l'hémoglobine, S. Herold n'a jamais observé la formation d'un tel intermédiaire. Ce résultat, associé au fait que cette réaction mène à la formation de 100 % nitrates, l'avait amenée à suggérer un mécanisme concerté d'isomérisation du PN au site catalytique des globines [141]. Nous suggérons que dans le cas de la réaction avec iNOSoxy à pH alcalin, une partie du PN fixé à l'hème puisse suivre ce chemin. Ainsi nous proposons qu'en absence d'un proton pour faciliter la rupture homolytique de la liaison O-O du PN, la réaction puisse passer par un mécanisme concerté d'isomérisation du PN *in situ*, sans formation de l'intermédiaire oxoferryl (I). Cette hypothèse renforcerait le modèle suivant lequel la formation de l'intermédiaire (I) ne serait efficace qu'à partir du complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}]$.

L'étude des transitions du spectre d'absorption de iNOSoxy au cours de la réaction d'activation de PN à différentes valeurs de pH, nous a permis de mettre en évidence l'existence d'au moins deux espèces en amont de l'intermédiaire (I) : les complexes $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PN}]$ et $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}]$. Seul ce dernier permettrait la formation de l'intermédiaire (I), la présence d'un

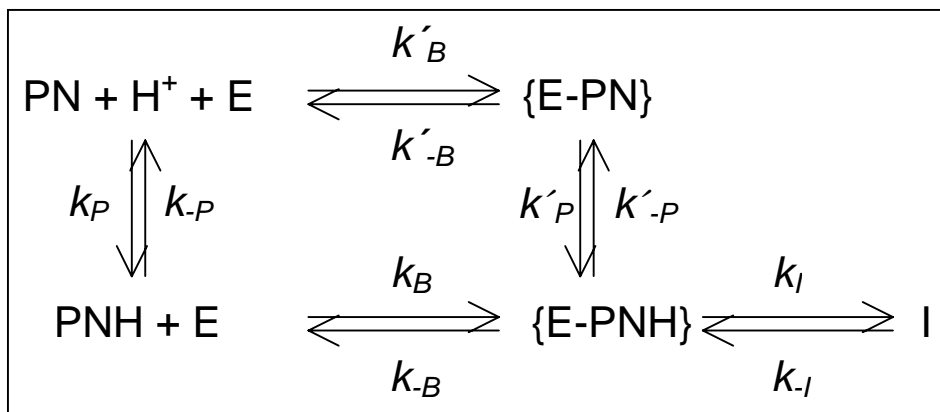


Figure III.27. Schéma réactionnel proposé pour la formation de l'intermédiaire (I).

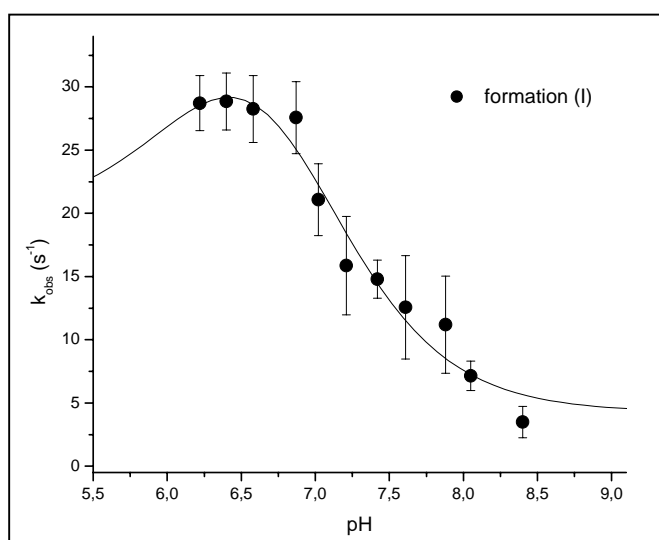


Figure III.28. Représentation graphique de l'évolution des constantes de vitesse observées pour la formation de l'intermédiaire à 443 nm, lors de la réaction de 100 μM PN avec iNOSoxy dans KPi 0,1 M pH 7,4 ($-\text{CO}_2$), en fonction de la valeur du pH.

	Modélisation
$\text{pKa}\{\text{PN/PNH}\}$	6,80
$\text{pKa}\{\text{E-PN/E-PNH}\}$	6,64
k'_B	$46 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_B	$6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k'_{-B}	$1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$
k_{-B}	$7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$
k_I	$183,6 \text{ s}^{-1}$
k_{-I}	$4,3 \text{ s}^{-1}$
c	$1 \times 10^{-4} \text{ M}$

Table III.7. Valeurs obtenues lors de la modélisation de l'évolution de la constante de vitesse de formation de l'intermédiaire (I) en fonction du pH, avec l'équation élaborée suivant le schéma réactionnel présenté figure III.27.

proton pour assister le fer semblant être requise pour une rupture homolytique efficace de la liaison O-O. Ainsi ce modèle réactionnel induirait une double dépendance en pH de la réaction de formation de l'intermédiaire (I) due aux pKa des couples PNH/PN et $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}]/[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PN}]$. Pour vérifier cette hypothèse, nous proposons à présent une nouvelle analyse cinétique des constantes de vitesses de formation de (I) (voir 2.1.2.).

2.3. Modélisation de l'évolution des constantes cinétiques de formation de (I) en fonction du pH suivant le nouveau modèle réactionnel :

Dans le but de construire un modèle cinétique qui pourrait expliquer une double dépendance en pH de la réaction de formation de l'intermédiaire (I), différentes hypothèses et approximations ont été formulées. Tout d'abord, l'étape de fixation du PN ou PNH doit contrôler la réaction sans quoi il n'y aurait pas de dépendance de la vitesse de formation de (I) par rapport à la concentration de PN (voir 2.1.1.). Ensuite, nous avons supposé la réversibilité de la réaction de formation de (I), ce qui permet une étude en phase stationnaire sur le complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}]$ et non sur (I). Enfin, pour simplifier les calculs, nous avons considéré que les réactions de transfert de proton doivent être en équilibre rapide suivant l'hypothèse de R. P. Bell [159]. La figure III.27 présente le modèle réactionnel proposé pour la formation de l'intermédiaire (I). L'ensemble des hypothèses formulées mène à l'élaboration de l'équation suivante :

$$k_{\text{obs}} = \frac{(k'_B 10^{pH-pKa(\text{HPN})} k_I + k_B k_I) [\text{HPN}]_{\text{TOT}}}{(1 + 10^{pH-pKa(\text{HPN})}) (k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{\text{HPNE}\})} + k_{-B} + k_I)} + \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{\text{HPNE}\})} + k_{-B}) k_{-I}}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{\text{HPNE}\})} + k_{-B} + k_I}$$

dont le détail mathématique est présenté en annexe (5.2.). Les constantes de vitesse observées pour la formation de l'espèce (I) en fonction du pH (k_{obs}) ont alors été modélisées par cette équation, en imposant la valeur du pKa du couple (PNH/PN) à 6,8 et la concentration totale de PN ($[\text{HPN}]_{\text{TOT}}$ ou c) à 100 μM . La courbe et les paramètres donnés par la modélisation sont présentés figure III.28 et table III.7 respectivement.

Cette modélisation est tout à fait satisfaisante et semble mieux représenter l'évolution des constantes cinétiques que celle précédemment établie (voir 2.1.2., fig. III.23) et notamment pour les valeurs mesurées à $\text{pH} < 7$. Du fait du peu de données dont nous disposons et de la faible gamme de pH étudiée, nous n'attribuons aucune légitimité aux constantes cinétiques

données par cette modélisation. Seules la valeur du pKa du couple $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}]/[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PN}]$ et les tendances cinétiques de la réaction ont donc été prises en considération.

Tout d'abord, les ordres de grandeurs obtenus pour les constantes de vitesse valident l'hypothèse de phase stationnaire effectuée sur les états liés, $\{\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}\}$ et $\{\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PN}\}$, et légitime notre traitement mathématique (table III.7). Ensuite, le pKa du couple $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}]/[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PN}]$ a été calculé à 6,64, ce qui est légèrement plus faible que le pKa du couple PNH/PN (6,8) et semble en accord avec la théorie. La réaction de formation de (I) à partir du complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}]$ est rapide et déterminée à $\approx 184 \text{ s}^{-1}$, et satisfait la condition de réversibilité avec une constante de dissociation de 4 s^{-1} . La modélisation indique par ailleurs une fixation préférentielle de PN à l'hème, qui serait 7 à 8 fois plus rapide que celle de PNH. Enfin, les vitesses de fixation ($10^8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et surtout de dissociation (10^5 s^{-1}) de PN ou PNH à l'enzyme semblent en accord avec l'hypothèse de formation instantanée des complexes $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}]$ et $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PN}]$ et peuvent rendre compte du contrôle de la réaction par l'étape de fixation de PN ou PNH.

Ce nouveau modèle cinétique permet de mettre en évidence une double dépendance en pH de la réaction de formation de l'intermédiaire (I), comme précédemment observé pour la réaction entre PN et certaines métalloporphyrines [160]. Cependant, il ne permet pas de déterminer les paramètres cinétiques relatifs à chaque étape du mécanisme de manière satisfaisante. Pour ce faire, il faudrait réaliser diverses expériences complémentaires et accumuler plus de données. Reste donc à présent à engager des campagnes de mesures des cinétiques de la réaction dans diverses conditions afin de déterminer les paramètres cinétiques de chaque espèce. Pour commencer nous suggérons l'étude de l'évolution de la constante de vitesse de formation de l'intermédiaire (I) en fonction de la concentration de PN, à différentes valeurs de pH. La limite de cette étude est la gamme de pH sur laquelle peut être réalisée l'expérience. En effet, en deçà de $\text{pH} = 6,2$ la protéine se dénature et au-delà de $\text{pH} = 8,4$ il semble que la décomposition du PN par iNOSoxy ne passe plus majoritairement par la réaction de formation de l'intermédiaire (I). En effet, nous avons suggéré qu'en absence de proton pour catalyser la rupture homolytique de la liaison O-O, la réaction puisse passer par une simple isomérisation du PN fixé au fer, suivant un mécanisme de réarrangement intramoléculaire comme dans le cas des globines, formant 100 % de nitrates [141]. Pour répondre à ce point, il faudrait pouvoir mesurer les concentrations de nitrites et de nitrates formés par la réaction, ce qui nécessitera la mise au point d'un protocole adapté (voir 1.3.4.).

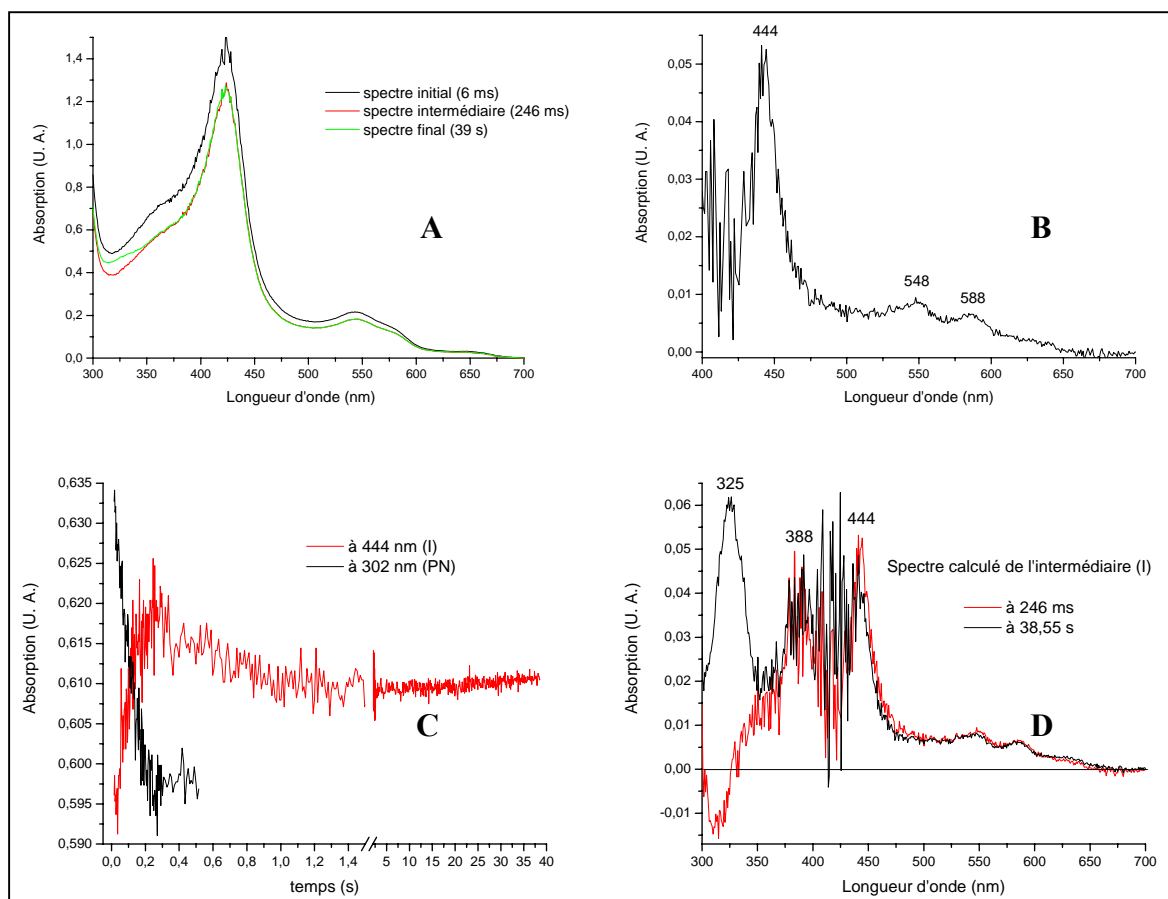


Figure III.29. Superposition des spectres d'absorption enregistrés après mélange rapide de iNOSoxy native et PN en conditions stoechiométriques (30 μM) à 4 °C dans KPi 0,1 M à pH 7,4 en absence de CO_2 . **A.** Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 6 ms, 246 ms et 38 s de réaction. **B.** Spectre d'absorption calculé pour l'intermédiaire (I) à $t = 246$ ms par soustraction de 93 % du spectre enregistré à 9 ms. **C.** Superposition des traces cinétiques enregistrées à 302 nm (PN) et à 444 nm (I). **D.** Superposition des spectres d'absorptions calculés à $t = 246$ ms (rouge) et $t = 38,55$ s (noir) par soustraction de 93 % du spectre enregistré à 9 ms. Mise en évidence de la persistance de l'intermédiaire (I) dans le temps.

Toutes les réactions réalisées jusqu'ici ont été menées en condition d'excès de PN par rapport à l'enzyme. Pour comprendre le devenir de l'intermédiaire (I) nous proposons à présent une étude de la réaction en conditions stoechiométriques de concentrations.

2.4. Analyse de la réaction d'activation d'un équivalent stoechiométrique de PN par iNOSoxy à différentes valeurs de pH :

Nous avons étudié l'activation du PN par iNOSoxy en conditions stoechiométriques de concentration (30 μM final) dans du tampon KPi 0,1 M ($-\text{CO}_2$) à différentes valeurs de pH : 6,5, 7,4 et 8,0. Le dispositif de mélange rapide a été réglé en température à 4 °C afin de ralentir la réaction et permettre l'observation de toutes les étapes.

Dans chaque condition, les spectres d'absorption enregistrés au cours de la réaction stoechiométrique de iNOSoxy et PN ont été superposés pour permettre l'analyse détaillée des transitions spectrales de l'enzyme. Les mêmes observations générales sont extraites de chaque expérience et nous proposons de les illustrer par l'analyse de la réaction à pH 7,4 présentée figure III.29. Les analyses détaillées des transitions spectrales pour les réactions menées à pH 6,5 et 8,0 ont été reportées en annexes (6.1.) et (6.2.) respectivement.

Tout d'abord, en rapport stoechiométrique de concentrations entre iNOSoxy et PN et quelle que soit la valeur du pH, la réaction passe toujours par la formation rapide de l'intermédiaire (I) précédemment décrit (fig. III.29-B). La constante de vitesse de décomposition du PN par iNOSoxy à pH 7,4 a été déterminée à $7,8 \text{ s}^{-1}$, ce qui est proche de la valeur déterminée précédemment (pour 30 μM iNOSoxy à pH 7,4 : $k_{\text{obs}} = 6,3 \text{ s}^{-1} \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$, voir 1.2.2.). Cependant, cette comparaison n'est faite qu'à titre indicatif puisque les réactions n'ont pas été menées à la même température (4 °C contre 20 °C). De plus, la constante de vitesse d'activation du PN par iNOSoxy a été calculée par modélisation mono-exponentielle et correspond parfaitement à la constante de vitesse observée pour la formation de (I). Ces résultats suggèrent : 1) que tout le PN passe par l'enzyme ; 2) que la formation de (I) est directement liée à la réaction directe du PN (et/ou PNH) avec l'enzyme native (Fe^{III}).

La superposition des spectres d'absorption, présentée figure III.29-A, ne permet pas l'observation directe de l'intermédiaire (I). En effet, son intensité est faible et le calcul de son spectre d'absorption suggère que seule une faible proportion d'intermédiaire soit formée (< 7 % iNOSoxy totale). De plus le spectre d'absorption final n'indique pas de déplacement de la bande de Soret, ce qui rappelle les observations faites au cours de l'analyse de la

réaction en excès de PN à pH 8,4. Ainsi, nous suggérons qu'une partie de la réaction ne passe pas par l'intermédiaire (I) et qu'une réaction rapide d'isomérisation intramoléculaire du PN fixé au fer puisse avoir lieu, avec probable formation de nitrates.

La figure III.29-C présente la superposition des traces cinétiques enregistrées à 302 nm (PN) et à 444 nm (I). Après consommation du PN et formation de l'intermédiaire (I) (3 - 250 ms), 30 % seulement de l'absorption à 444 nm disparaît (250 ms - 1 s). Ensuite le signal ne semble pas évoluer, ce qui suggère la persistance d'une fraction de l'intermédiaire (I) jusqu'à la fin de la mesure. La figure III.29-D confirme ce résultat et montre que le spectre d'absorption de l'intermédiaire (I) peut être extrait du spectre enregistré à $t = 38,55$ s, par la même opération de calcul que celle réalisée à partir du spectre enregistré à $t = 246$ ms (fig. III.29-B). Nous observons également une faible proportion d'espèce avec un maximum d'absorption autour de 390 nm.

La superposition des spectres calculés pour l'intermédiaire (I) à 246 ms et 38,55 s (fig. III.29-D), indique l'apparition d'une bande d'absorption à 325 nm, par ailleurs observée sur le spectre d'absorption final (fig. III.29-A). En condition d'excès de PN par rapport à iNOSoxy, cette absorption à 325 nm était transitoire, et disparaissait pendant la phase d'épuisement de l'intermédiaire (I) (voir 2.2.). En conditions stoechiométriques cette absorption apparaît lentement entre 250 ms et 38 s. Ainsi, il semble que l'absorption à 325 nm soit associée d'une certaine manière à l'existence de l'intermédiaire (I), mais sans être pour autant caractéristique de l'intermédiaire (I).

Enfin, la superposition des spectres d'absorption (fig. III.29-A) ne montre pas d'apparition de la bande d'absorption à 624 nm, ce qui suggère que l'apparition de cette bande soit directement liée à la disparition de (I) et/ou à la disparition de l'absorption à 325 nm.

Ces observations ont été faites lors de l'analyse de la réaction à pH 7,4 mais semblent valables pour la réaction à pH 6,5. Par contre, lors de la même étude réalisée à pH 8,0, la persistance de l'intermédiaire (I) et de l'absorption à 325 nm n'a pas été observée.

L'étude de la réaction de PN avec iNOSoxy en rapport stoechiométrique de concentrations semble supporter l'existence de deux mécanismes distincts, avec des vitesses globales proches. Tous deux impliquent une première étape de fixation de PN au fer de l'hème. Le complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PN}]$ alors formé évoluerait soit suivant un mécanisme de réarrangement intramoléculaire, soit suivant un mécanisme de rupture homolytique de la liaison O-O pour former l'intermédiaire (I), avec *a priori* assistance par un proton. Par ailleurs il semble que

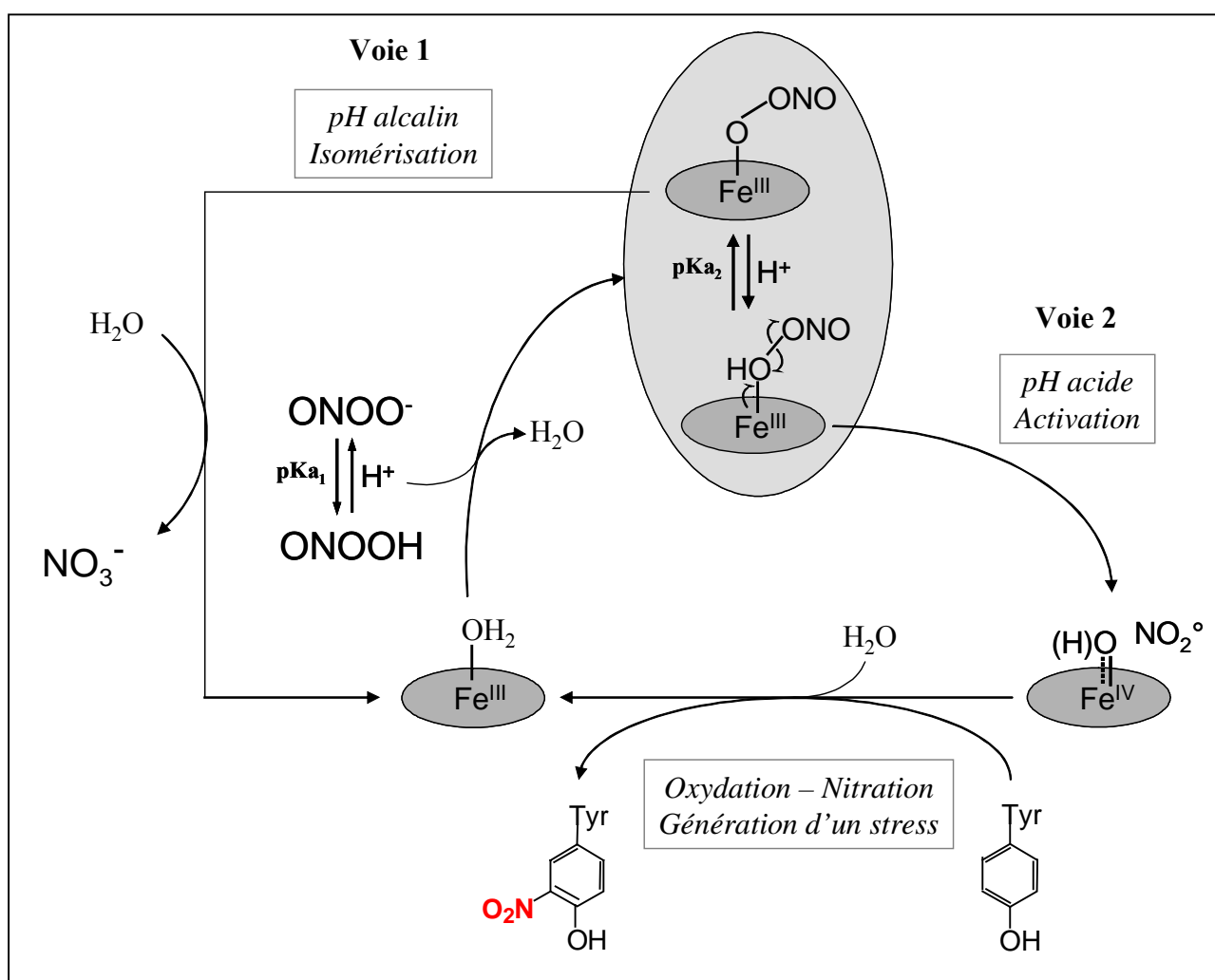


Figure III.30. Modèle réactionnel simple proposé pour l'activation du PN par iNOSox.

dans certaines conditions de pH, l'intermédiaire (I) ne disparaît pas totalement lorsque la réaction est menée en conditions stoechiométriques. Soit parce qu'il serait stabilisé, avec dans ce cas possible intervention du composé qui absorbe à 325 nm, soit parce qu'il serait bloqué dans un état oxydé et nécessiterait la présence d'un réducteur pour retourner à l'état natif Fe^{III} , comme il l'a été proposé pour la réaction du PN avec les métalloporphyrines à fer (voir 1.1.2.1.).

Ces expériences de mélange rapide entre PN et iNOSoxy en condition de stoechiométrie sont préliminaires et nécessitent d'être répétées à différentes températures (à commencer par 20 °C) et à différentes valeurs de pH pour comprendre, notamment, les conditions de persistance de l'intermédiaire (I). Par ailleurs, elles suggèrent que les étapes préliminaires conduisant à la formation de (I) puissent être plus complexes.

2.5. Discussion et perspectives :

Une analyse détaillée de la réaction entre PN et iNOSoxy, par technique de mélange rapide, nous a permis de proposer un nouveau modèle réactionnel simple pour l'activation du PN par iNOSoxy, présenté figure III.30.

Dans un premier temps, le peroxy-nitrite (ONOO^-) ou l'acide peroxy-nitreux (ONOOH) pourraient tous deux se fixer au fer de l'hème. Cette réaction serait rapide, dépendrait de la valeur du pH de la solution ($\text{pK}_a(\text{PNH}/\text{PN}) = 6,8$), et conduirait à la formation des complexes $[\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OONO}]$ et $[\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}(\text{H})\text{ONO}]$ respectivement. Nous proposons ensuite que le complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OONO}]$ puisse soit évoluer vers un mécanisme de réarrangement intramoléculaire (voie 1), avec *in fine* possible libération de nitrates [141], soit fixer un proton pour former le complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}(\text{H})\text{ONO}]$ (voie 2). Le complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}(\text{H})\text{ONO}]$, lui, évoluerait par rupture homolytique de la liaison O-O pour former un intermédiaire oxoferryl $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ (l'intermédiaire (I)) et un radical $\cdot\text{NO}_2$, ensemble responsables de l'activité de nitration du système $\{\text{iNOSoxy} + \text{PN}\}$. Ainsi, l'étape de protonation *in situ* du PN, soit une fois fixé au fer, impliquerait une deuxième dépendance en pH de la réaction de formation de l'intermédiaire (I) ($\text{pK}_a(\text{Fe}^{\text{III}}-\text{PNH}/\text{Fe}^{\text{III}}-\text{PN}) \approx 6,6$).

Ce mécanisme repose sur l'observation d'au moins deux intermédiaires en amont de la formation du complexe oxoferryl, avec des maxima d'absorption autour de 390 et 411 nm. Nous avons proposé qu'ils puissent correspondre aux complexes $[\text{Fe}^{\text{III}}-\text{PNH}]$ et $[\text{Fe}^{\text{III}}-\text{PN}]$ respectivement, $[\text{Fe}^{\text{III}}-\text{PN}]$ ayant déjà été observé à 410 nm par S. Herold lors de la réaction de la myoglobine avec PN. Cependant, sur la base de calculs théoriques, S. Goldstein [161]

réfute cette attribution et propose que l'absorption à 410 nm corresponde plutôt à l'isomère $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-ONO}_2]$. En effet, le complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PN}]$ aurait une durée de vie de l'ordre de la microseconde et formerait rapidement la paire $\{\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O} + \cdot\text{NO}_2\}$. La recombinaison instantanée de ce système formerait l'isomère $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-ONO}_2]$, d'une durée de vie de l'ordre de la milliseconde et donc seul observable. Suivant cette hypothèse la réaction stoechiométrique entre iNOSoxy et PN serait totalement achevée en moins de 3 ms, ce qui ne semble pas correspondre à nos données cinétiques. De plus, il n'est pas absurde de penser que l'environnement complexe du site actif d'une protéine, par opposition aux complexes modèles (métalloporphyrines), puisse stabiliser les intermédiaires $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PN}]$ et $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-PNH}]$ et les rendre observables.

Le second point sur lequel repose notre modèle réactionnel est la nature de l'intermédiaire (I) et son mode de formation (double dépendance en pH). En effet, pour rendre compte des observations de réactivité du système $\{\text{iNOSoxy} + \text{PN}\}$, nous avons proposé qu'il puisse être un composé II oxoferryl (voir 1.4.), conformément aux précédentes études sur des protéines à centre hémithiolate [144]. Cependant, différentes propositions ont été faites pour expliquer sa formation. Par exemple, dans la réaction de mélange rapide entre PN et le cytochrome $\text{P450}_{\text{BM-3}}$, A. Daiber suggère que l'oxoferryl soit plutôt issu de la réaction du PN avec le composé I, formé par une première réaction stoechiométrique de rupture hétérolytique de la liaison O-O du PN fixé au Fe^{III} . Les cinétiques de formation de l'oxoferryl ont alors été modélisées par une fonction bi-exponentielle avec des constantes de vitesse peu distinctes, de $6,5 \text{ s}^{-1}$ et $1,29 \text{ s}^{-1}$. Dans le cas de la chloroperoxydase, un des rares « P450 » pour lequel les spectres d'absorption des composés I et II ont été décrits [162, 163], A. Daiber indique plutôt la formation directe de l'oxoferryl suivant une rupture homolytique de la liaison O-O. Ainsi les cinétiques de formation de l'oxoferryl ont été parfaitement modélisées par une fonction mono-exponentielle, avec une constante de vitesse de 30 s^{-1} à pH 6,8. Puisque nos résultats semblent reproduire ceux obtenus pour la chloroperoxydase, l'hypothèse de formation directe d'un composé II a été retenue pour la réaction entre iNOSoxy et PN, sans passage préalable par un composé I.

Cependant, certains résultats restent inexpliqués par notre modèle et mériteraient d'être approfondis. Par exemple, la persistance de l'intermédiaire (I) lorsque la réaction est menée en rapport de concentrations stoechiométrique suggère un mécanisme type métalloporphyrine à fer. Alors la réaction de décomposition du PN, en condition d'excès de PN, serait principalement catalysée par le composé II, et non par l'enzyme native Fe^{III} . Cependant, si la catalyse de la réaction de décomposition d'un excès de PN par un complexe oxoferryl de

iNOSoxy plutôt que par sa forme native Fe^{III} ne peut être exclue, nous n'avons pas observé d'accélération significative de la vitesse de décomposition du PN par iNOSoxy lorsque l'expérience a été menée en condition de stoechiométrie.

Néanmoins il serait intéressant de reproduire toutes nos expériences en présence d'un réducteur, type ascorbate, qui, suivant le mécanisme des métalloporphyrines, régènerait l'enzyme native (Fe^{III}) à partir de l'intermédiaire oxoferryl. Si la vitesse de réduction de l'oxoferryl n'est pas cinétiquement limitante ($\approx 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les métalloporphyrines à fer), nous devrions alors observer une accélération de la réaction de décomposition du PN, la réaction stoechiométrique $\{\text{Fe}^{\text{III}} + \text{PN}\}$ étant d'un ordre de grandeur plus rapide que $\{\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O} + \text{PN}\}$. D'un point de vue physiologique, il serait par ailleurs intéressant de réaliser cette expérience de mélange rapide en condition stoechiométrique d'enzyme et de PN en présence de composés cibles de l'activité de nitration (phénols type HPA) qui, suivant nos hypothèses, devraient également permettre la régénération de l'enzyme native.

Enfin l'observation transitoire d'une bande d'absorption autour de 320 nm suggère la possible intervention de résidus acides aminés, type tryptophane, dans le mécanisme d'activation du PN par iNOSoxy en conditions d'excès de PN. Ainsi, la mutation des tryptophanes (W188-366-457) et de la tyrosine (Y367) situés à proximité de l'hème, et l'étude de la réaction de ces mutants iNOSoxy avec PN, pourraient ouvrir de nouvelles perspectives. En effet, il n'est pas exclu que ces résidus puissent servir de relais pour les électrons comme il a été récemment proposé pour la réaction du PN avec la prostaglandine endoperoxyde H synthase-1 [164], ou celle des peracides avec le cytochrome P450_{CAM} [165]. Dans ce cas la réaction passerait par la formation d'un composé I avec délocalisation immédiate du radical de la porphyrine sur les résidus aromatiques environnants, mécanisme par ailleurs supporté par les travaux de C. Jung sur différentes hémoprotéines type cytochromes P450, dont iNOSoxy [166, 167]. Ceci étant, la formation d'un radical tryptophane pourrait également intervenir par réaction directe du PN avec un résidu tryptophane, sans passer par la formation d'un composé I du fer. Puisque l'altération de la coordination native de l'enzyme (bande d'absorption à 624 nm) semble être corrélée à la disparition de cette absorption à 325 nm, fort est à penser que ce résidu se situerait au site actif de la protéine plutôt qu'en surface. Cependant, en conditions stoechiométriques de PN et d'enzyme, l'absorption à 325 nm n'est plus transitoire et apparaît lentement après totale disparition du PN, ce qui va en défaveur de l'hypothèse de formation d'un radical. Quoi qu'il en soit, il est clair que cette absorption est intrinsèquement liée à l'intermédiaire (I) et nous proposons d'être attentif à son existence lors de la réalisation d'expériences complémentaires. Entre autres, il serait intéressant d'observer si cette

absorption apparaît ou non lorsque les expériences de mélange rapide sont réalisées en présence du co-facteur H_4B au site catalytique de l'enzyme.

Le mécanisme que nous proposons pour l'activation du PN par iNOSoxy semble corrélérer avec l'ensemble de nos observations expérimentales. Puisque la fixation du PN à l'enzyme semble être une étape limitante de la réaction, nous proposons que les expériences menées en conditions d'excès de PN représentent mieux la réaction dite cytotoxique des NOSs (synthèse du PN au site actif), que les expériences réalisées en conditions de stoechiométrie. En effet, quelles que soient les conditions expérimentales, la réaction passe par la formation de l'intermédiaire (I) à pH physiologique, et seul son devenir (disparition ou persistance) les différencie. Cependant ce modèle réactionnel ne pourra être validé qu'après piégeage et caractérisation des différents intermédiaires de la réaction, à commencer par l'intermédiaire (I). Ainsi ces travaux, qui mettent en évidence les conditions d'observations des différentes espèces formées, constituent une base expérimentale fiable pour à terme déterminer leur nature, en combinant plusieurs techniques spectroscopiques telles que le Raman de résonance et la RPE.

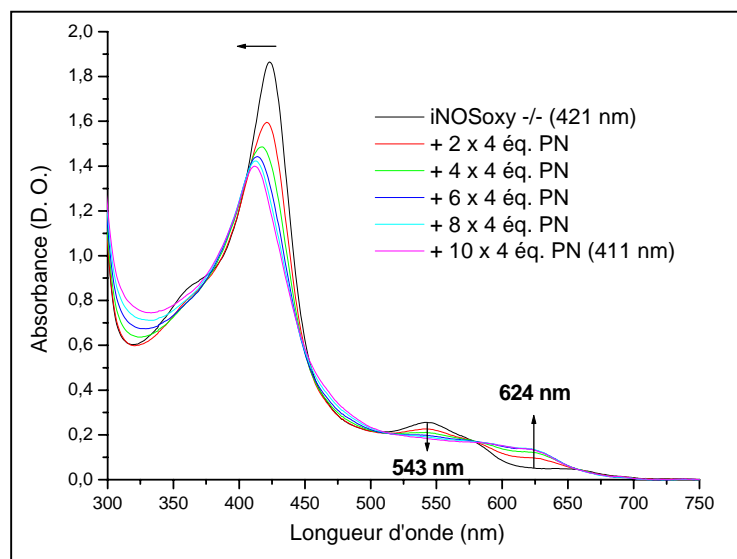


Figure III.31. Superposition des spectres d'absorption UV-visible de iNOSoxy native (-/-) modifiée par 2 - 4 - 6 - 8 - 10 additions de 4 éq. PN dans KPi 0,1 M plus DTPA 0,3 mM pH 7,4.

3. Conséquence de l'activation du peroxynitrite sur l'intégrité structurale et fonctionnelle de iNOSoxy :

Nous avons montré que iNOSoxy active la décomposition du PN et en modifie la réactivité pour favoriser la formation d'espèces capables d'oxyder et de nitrer des composés aromatiques du milieu extérieur (voir 1.). Cependant en condition d'excès de PN, nous avons observé une modification du spectre d'absorption final de l'enzyme, suggérant une altération de la coordination native de l'hème et/ou de son environnement (voir 2.). La protéine portant des acides aminés cibles pour la réactivité du PN activé par l'hème à proximité du site actif (cystéine, tyrosine, tryptophane, phénylalanine), nous suggérons que les modifications observées sur le spectre d'absorption de iNOSoxy puissent témoigner de l'oxydation à un électron ou de la nitration de ces résidus.

Suivant cette hypothèse, nous avons cherché à obtenir des preuves spectroscopiques permettant d'identifier la nature des modifications de l'enzyme, en portant une attention particulière à l'oxydation du ligand cystéine proximal et à la nitration de résidus tyrosine. Pour ce faire plusieurs techniques spectroscopiques ont été utilisées, telles que l'absorption UV-visible, le Raman de résonance et la RPE. Afin d'incrémenter le degré de modification de l'enzyme, nous avons, pour chaque série d'expériences, réalisé des gammes de iNOSoxy modifiée par un nombre croissant d'additions d'excès de PN. Enfin, pour savoir quel pouvait être l'effet de telles modifications sur le fonctionnement enzymatique de la protéine, nous avons mesuré la capacité de iNOSoxy, après traitement au PN, à synthétiser du NO et à activer la décomposition du PN.

L'ensemble des résultats obtenus nous amènera à discuter le rôle physiologique de iNOSoxy dans la génération d'un stress oxydant et nitrant, suivant que le PN est synthétisé *in situ* dans un rapport de concentration stoechiométrique par rapport à l'enzyme, ou *ex situ* soit en excès de PN par rapport à iNOSoxy.

3.1. Mise en évidence d'une oxydation auto-catalytique de iNOSoxy :

3.1.1. Modification du spectre d'absorption UV-visible de iNOSoxy :

La figure III.31 présente l'effet de plusieurs additions successives de 4 éq. PN sur le spectre d'absorption UV-visible de iNOSoxy en absence de substrat et de co-facteur à pH 7,4.

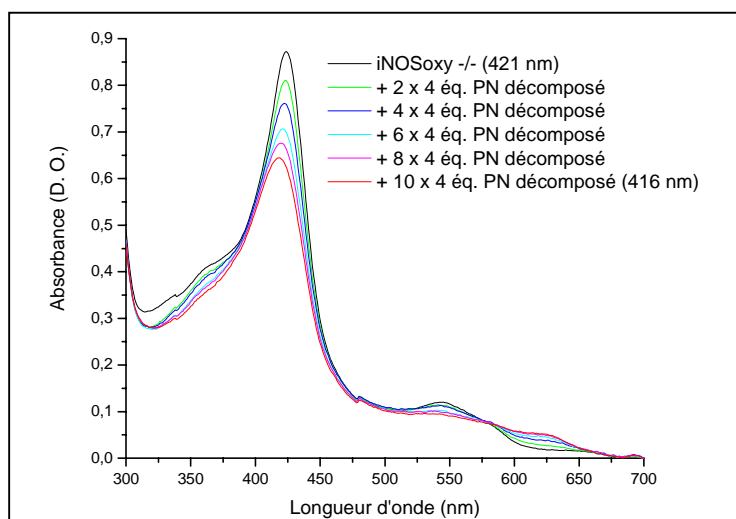


Figure III.32. Superposition des spectres d'absorption UV-visible de iNOSoxy native, puis après 2, 4, 6, 8, 10 additions de 4 éq. PN décomposé dans KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA pH 7,4.

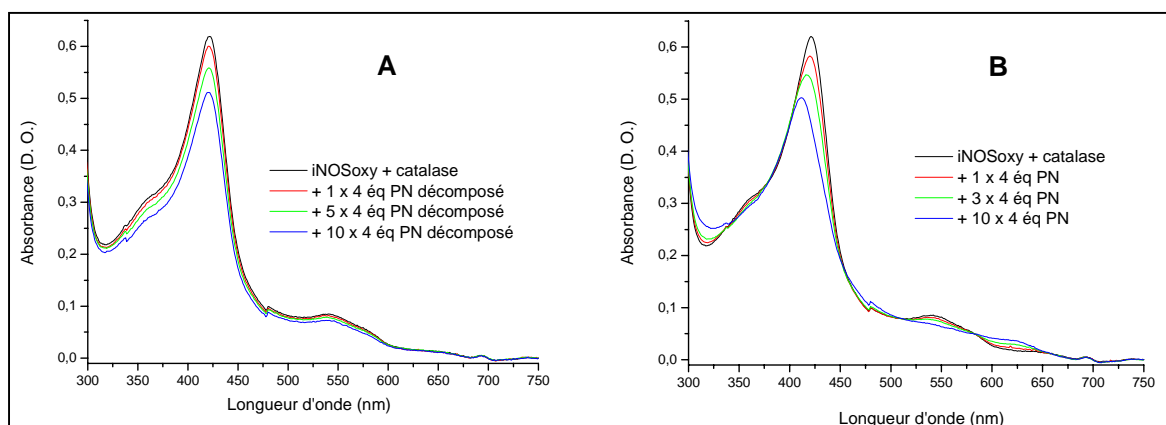


Figure III.33. Superposition des spectres d'absorption UV-visible de iNOSoxy native en présence de 23,5 mg.L⁻¹ de catalase dans KPi 0,1 M pH 7,4 plus 0,3 mM DTPA puis après **A)** 1, 5, 10 additions de 4 éq. PN décomposé et **B)** 1, 3, 10 additions de 4 éq. PN.

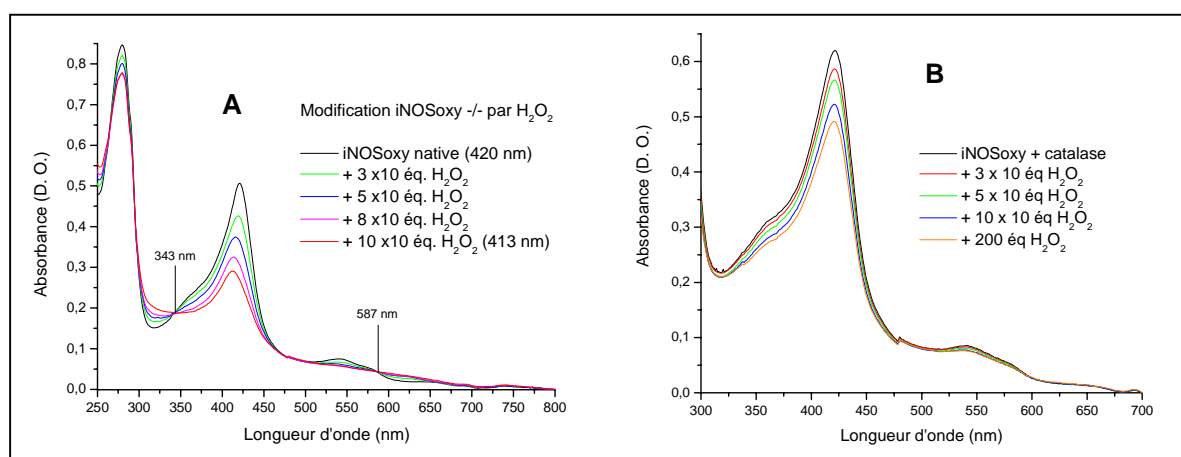


Figure III.34. A. Superposition des spectres d'absorption UV-visible de iNOSoxy native, puis après 3, 5, 8, 10 additions de 10 éq. H₂O₂ dans KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA pH 7,4. **B.** Répétition de l'expérience en présence de 23,5 mg.L⁻¹ de catalase dans le milieu.

L'apparition d'une nouvelle bande d'absorption à 624 nm est observée, accompagnée du déplacement de la bande de Soret de 421 nm à 411 nm. Après cinq additions de PN la modification du spectre d'absorption à 624 nm est totale, alors que dix additions sont nécessaires au déplacement de la bande de Soret à 411 nm. Ces observations suggèrent deux types distincts de modification du site catalytique qui pourraient être dus à l'oxydation et/ou à la nitration de résidus autour de l'hème.

Des additions successives de 4 éq. PN préalablement décomposé dans KPi 0,1 M pH 7,4, induisent les mêmes modifications du spectre d'absorption de iNOSoxy (fig. III.32). *A priori* nous pouvons exclure l'hypothèse de fixation d'un produit de décomposition du PN à l'hème puisque l'incubation de iNOSoxy avec 10^4 éq. nitrites ou nitrates n'a aucun effet sur le spectre d'absorption de l'enzyme. L'addition de catalase supprime l'effet du PN décomposé sur le spectre d'absorption de iNOSoxy (fig. III.33-A), qui semble donc provenir d'une contamination par H_2O_2 de nos solutions commerciales de PN. Cependant, la catalase ne supprime pas les modifications du spectre d'absorption de iNOSoxy induites par PN (fig. III.33-B), ce qui prouve qu'elles sont bien liées à l'activation du PN par l'enzyme et non à une réaction parasite due à la présence éventuelle de H_2O_2 . Enfin, cette expérience nous permet de vérifier que PN n'est pas substrat de la catalase [140].

Ainsi H_2O_2 induit les mêmes modifications du spectre d'absorption de la protéine que PN (fig. III.34-A et B) ce qui suggère que la modification du spectre d'absorption de iNOSoxy soit liée à une réaction d'oxydation au site actif de la protéine.

Par ailleurs, aucune modification supplémentaire n'a été observée par action de H_2O_2 sur iNOSoxy dans une solution saturée en nitrites.

3.1.2. Altération de la cystéine proximale et de l'environnement distal de l'hème :

L'incubation de iNOSoxy native avec du DTT conduit normalement à la formation d'un complexe bis-thiolate, caractérisé par deux bandes d'absorption à 376 et 460 nm. Si NOS perd son ligand cystéine proximal, un autre complexe avec un maximum d'absorption autour de 420 nm est observé [168]. La figure III.35-A présente les spectres d'absorption enregistrés après incubation en condition saturante de DTT de iNOSoxy native (spectre noir) et modifiée par cinq (spectre vert) et dix (spectre rouge) additions de PN. Plus le nombre d'additions de PN est grand, plus la bande d'absorption à 420 nm est majoritaire sur le spectre d'absorption du complexe bis-thiolate, ce qui suggère une altération partielle du ligand cystéine proximal

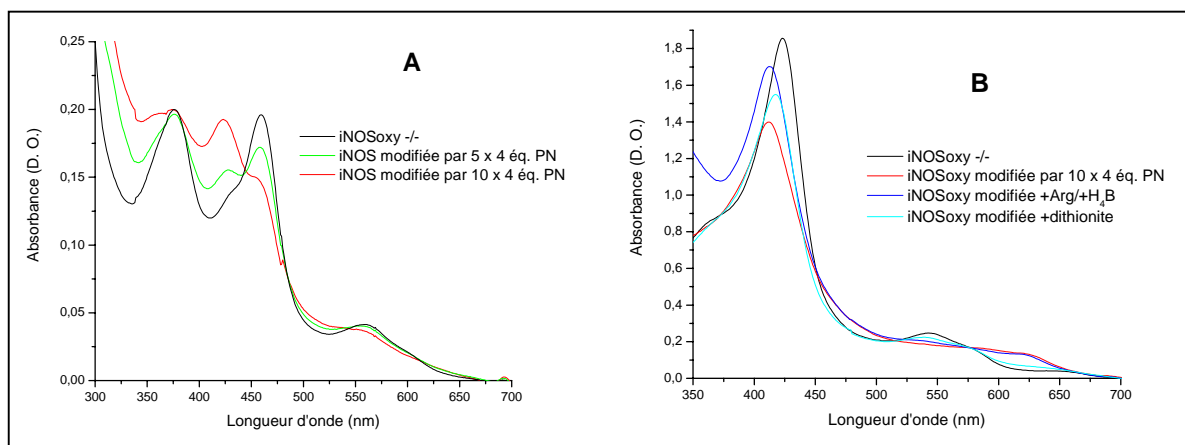


Figure III.35. Superposition des spectres d'absorption UV-visible de iNOSoxy native (noir) et après modification par cinq ou dix additions de 4 éq. PN, suivie de l'incubation en conditions saturantes **A)** de DTT, ou **B)** de Arg et H₄B.

	Traitement	P445/P420
iNOSoxy native	+ dithionite + CO	1,32
	1) + PN, 2) + dithionite + CO	0,61
iNOSoxy + Arg/+H ₄ B	+ dithionite + CO	1,70
	1) + PN, 2) + dithionite + CO	1,40
iNOSoxy native après modification par PN	1) + DTT, 2) + dithionite + CO	0,88
	1) + DTT, 2) + Arg + H ₄ B, 3) + dithionite + CO	0,83
	1) + Arg + H ₄ B, 2) + dithionite + CO	0,61
	1) + Arg + H ₄ B, 2) + DTT, 3) + dithionite + CO	0,91

Table III.8. Détermination du rapport P445/P420 du complexe Fe^{II}-CO dans différentes conditions après modification de iNOSoxy native par dix additions de 4 éq. PN.

de iNOSoxy après activation du PN, probablement par oxydation. Le DTT reste cependant capable de se fixer en position distale.

Ce n'est pas le cas de Arg et H₄B. En effet, après activation de dix additions PN, l'incubation de iNOSoxy native avec Arg et H₄B ne permet pas le déplacement de la bande de Soret à 395 nm ni l'apparition de la bande de transfert de charge à 650 nm (fig. III.35-B, spectre bleu foncé). Ainsi, il semble que les modifications structurales induites par l'activation de plusieurs excès de PN affectent également l'environnement distal de l'hème, empêchant la fixation de Arg et H₄B et leur effet sur l'état de spin du fer (transition BS → HS).

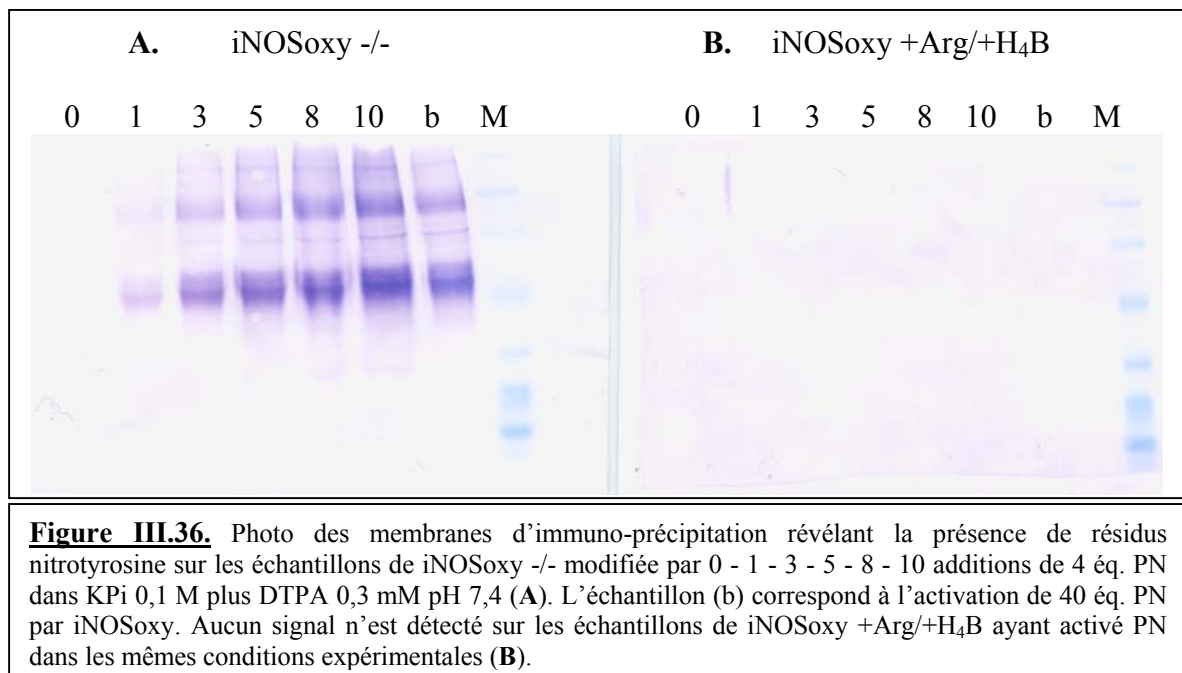
Le « test P450 » semble confirmer l'ensemble de ces résultats (voir chapitre II, 1.3.2.). En effet, deux facteurs induisent la formation réversible de « P420 » : 1) l'altération du lien thiolate proximal ; 2) l'absence de Arg et H₄B au site actif pour stabiliser le complexe Fe^{II}-CO ($\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ nm}$). La table III.8 rapporte les valeurs obtenues pour le rapport P445/P420 dans différentes conditions. Après traitement au PN de iNOSoxy native, le rapport P445/P420 est faible (0,61 contre 1,32 pour iNOSoxy native) et n'augmente pas après incubation avec Arg et H₄B. Ensemble, ces résultats prouvent l'altération du lien thiolate proximal.

3.1.3. Réversibilité et protection de iNOSoxy par la présence du substrat Arg :

Après traitement au PN, iNOSoxy a été incubée 30 min avec 500 mM DTT avant de réaliser le « test P450 ». Dans ces conditions, le rapport P445/P420 augmente, jusqu'à 0,91 (table III.8), indiquant une stabilisation du complexe Fe^{II}-CO. Ces résultats suggèrent une réduction partielle par le DTT des résidus de la poche héminique oxydés par PN.

La réversibilité de l'oxydation de certains résidus a également été observée par spectroscopie d'absorption après incubation de iNOSoxy modifiée par PN avec un excès de dithionite et reconditionnement dans du tampon KPi 0,1 M pH 7,4. Le spectre d'absorption enregistré est présenté figure III.35-B (spectre bleu clair). Il indique un retour de l'enzyme à son état natif avec un maximum d'absorption de la bande de Soret à 417 nm et un retour de l'absorption observée à 624 nm à son niveau basal. Ainsi le dithionite, qui est un réducteur plus fort que le DTT, permettrait l'extinction de l'absorption à 624 nm, alors que le DTT ne le permet pas (résultat non présenté).

Enfin, l'effet de plusieurs additions successives de PN sur le spectre d'absorption UV-visible de l'enzyme a également été étudié à partir de iNOSoxy +Arg/+H₄B. Dans ces conditions le spectre d'absorption de l'enzyme n'est pas modifié et la formation du complexe Fe^{II}-CO est peu altérée (table III.8). Comme l'activation du PN par iNOSoxy est inhibée en présence de substrat, ceci suggère que les modifications observées sur le spectre d'absorption de iNOSoxy



native sont directement corrélées à l'activation du PN par l'enzyme (voir 1.2.5.), et donc de nature auto-catalytique.

3.2. Mise en évidence d'une nitration auto-catalytique de iNOSoxy :

Les expériences menées jusqu'ici indiquent que l'activation d'un excès de PN par iNOSoxy induit des modifications au site actif de l'enzyme, corrélées au pouvoir oxydant du système {iNOSoxy + PN}. Cependant nous avons vu que iNOSoxy augmentait également l'activité de nitration du PN (voir 1.3.3.). Ainsi nous avons cherché à détecter la présence éventuelle de nitrotyrosine sur iNOSoxy modifiée par PN. Ce type de nitration auto-catalytique a par ailleurs déjà été observé par réaction du PN sur différentes protéines à centre hémithiolate, tels que les cytochromes P450_{BM-3}, P450_{CAM} ou la prostacycline synthase [144, 146, 169].

3.2.1. Par immuno-précipitation :

Nous avons réalisé une gamme d'échantillons de iNOSoxy native et +Arg/+H₄B modifiées par une à dix additions de 4 éq. PN. Les échantillons ont été débarrassés des produits de décomposition du PN et reconditionnés dans KPi 0,1 M pH 7,4 avant d'être analysés par immuno-précipitation avec des anti-corps anti-nitrotyrosine. La photo des membranes d'immuno-précipitation obtenues est présentée figure III.36. Tous les échantillons de iNOSoxy native modifiée par PN indiquent la présence de résidus nitrotyrosine. L'intensité de leur signal de détection est proportionnelle au nombre d'additions de PN activé par iNOSoxy native. Aucun signal n'est détecté pour les échantillons iNOSoxy +Arg/+H₄B ayant été exposés de la même façon au PN. Nous avons précédemment montré qu'en présence de substrat l'activation de PN par iNOSoxy était inhibée (voir 1.2.5.). Ainsi, ces résultats indiquent que la nitration de résidus tyrosine est directement liée à l'activation du PN par iNOSoxy, autrement dit qu'elle est de nature auto-catalytique.

Différentes conditions de dénaturation des échantillons de iNOSoxy modifiée par PN ont été testées (voir chapitre II, 1.2.1.). Aucune différence n'a été observée dans les profils de détection de nitrotyrosine, même en conditions dites réductrices avec du β -mercaptoéthanol.

Pour s'assurer que la formation de nitrotyrosines est propre à l'activation par iNOSoxy du PN, et non de contaminants, une gamme d'échantillons a été analysée par immuno-précipitation. Nous avons été particulièrement attentifs à une éventuelle activité peroxydase de iNOSoxy par réaction avec H₂O₂ en présence de nitrites. Cette réactivité, qui conduirait également à la formation de nitrotyrosine, a été mise en évidence récemment pour différents systèmes

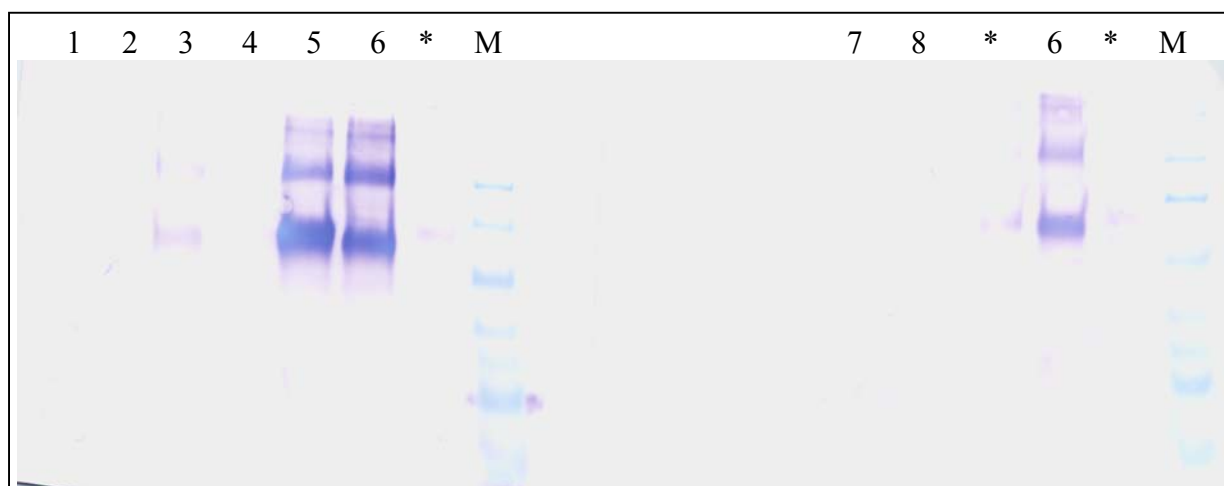


Figure III.37. Photo des membranes d'immuno-précipitation révélant la présence de résidus nitrotyrosine sur iNOSoxy 1) native, puis modifiée par 2) H_2O_2 plus catalase, 3) H_2O_2 plus NO_2^- , 4) H_2O_2 , 5) PN plus catalase, 6) PN, 7) H_2O_2 plus NO_2^- plus catalase, 8) PN décomposé. Un marqueur de poids moléculaire (M) migre en même temps que les échantillons. Les puits marqués par (*) sont dépourvus de test car l'échantillon (6) voisin a débordé.

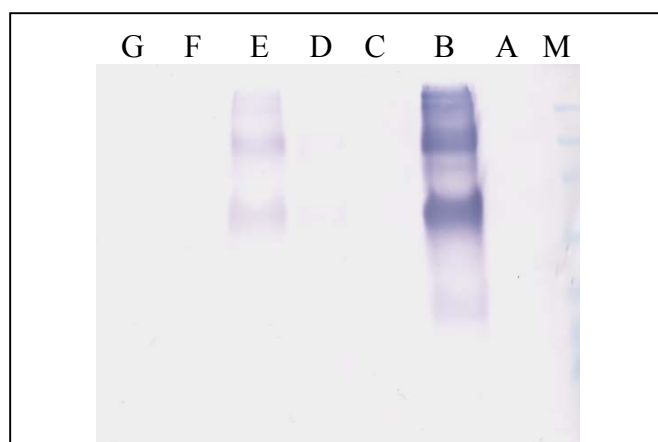


Figure III.38. Photo de la membrane d'immuno-précipitation révélant la présence de résidus nitrotyrosine sur iNOSoxy A) native, puis modifiée par B) 5 x 4 éq. PN, C) échantillon (B) après incubation avec dithionite, D) 8 x 10 éq. H_2O_2 plus 1 mM NO_2^- , E) 8 x 100 éq. H_2O_2 plus 1 mM NO_2^- , F) échantillon (E) après incubation avec dithionite, G) 8 x 100 éq. H_2O_2 plus 1 mM NO_2^- en présence de catalase. Un marqueur de poids moléculaire (M) migre en même temps que les échantillons.

hémiques tels que la myoglobine et l'hémoglobine [170]. La préparation des échantillons témoins de iNOSoxy a été suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible. La figure III.37 présente la photo des membranes d'immuno-précipitation obtenues. La modification de iNOSoxy par H_2O_2 seul ou PN décomposé n'entraîne pas de détection de résidus nitrotyrosine sur la protéine (puits 4 et 8). Par ailleurs, la présence de catalase lors de l'activation du PN par iNOSoxy n'empêche pas la détection de nitrotyrosines sur la protéine (puits 5). Ces résultats indiquent que la nitration de résidus tyrosine sur la protéine est bien liée à l'activation du PN et non à une réaction secondaire due à la présence de H_2O_2 , ou d'autres contaminants, dans les solutions commerciales. De plus, ces observations indiquent que la modification du spectre d'absorption de la protéine n'est pas liée à la nitration de résidus de la poche de l'hème, mais à leur seule oxydation.

Cependant, lorsque iNOSoxy (2 μM) est incubée en condition saturante de nitrites et modifiée par 500 μM H_2O_2 des traces de nitrotyrosine sont détectées (puits 3), disparaissant lorsque la réaction est conduite en présence de la catalase (puits 7). Nous mettons ici en évidence une activité de nitration liée à l'activation de iNOSoxy par H_2O_2 en présence de nitrites : c'est l'activité peroxydase. D'autres conditions ont alors été testées pour cette réactivité. La figure III.38 présente la photo de la membrane d'immuno-précipitation d'échantillons de iNOSoxy ayant réagi avec différentes quantités de H_2O_2 en condition saturante de nitrites. A 8 x 10 μM H_2O_2 la formation de nitrotyrosines sur iNOSoxy est presque négligeable (puits D). A 8 x 100 μM H_2O_2 , le signal de la nitrotyrosine est significatif (puits E) mais reste bien moins intense que celui observé après activation de 5 x 4 μM PN par iNOSoxy (puits B). iNOSoxy a donc bien une activité peroxydase. Cependant, au regard des quantités de H_2O_2 mises en jeu pour l'intensité du signal de nitrotyrosine obtenue, il est peu probable que cette activité soit significative *in vivo*.

Les échantillons de iNOSoxy modifiée par PN ont également été incubés, avant immuno-précipitation, avec différents agents réducteurs. Si le DTT n'altère pas la détection des nitrotyrosines, un excès de dithionite éteint totalement leur signal (puits C). Ce test assure la spécificité de l'anti-corps utilisé, le dithionite réduisant très probablement les groupes nitro- $-NO_2$ en amino- $-NH_2$ [171].

3.2.2. Par spectroscopie Raman de résonance :

Une analyse des échantillons de iNOSoxy modifiée par PN a été effectuée par spectroscopie Raman de résonance, qui permet non seulement de détecter la présence de résidus nitrotyrosine sur les protéines [172] mais surtout d'obtenir des informations sur leur

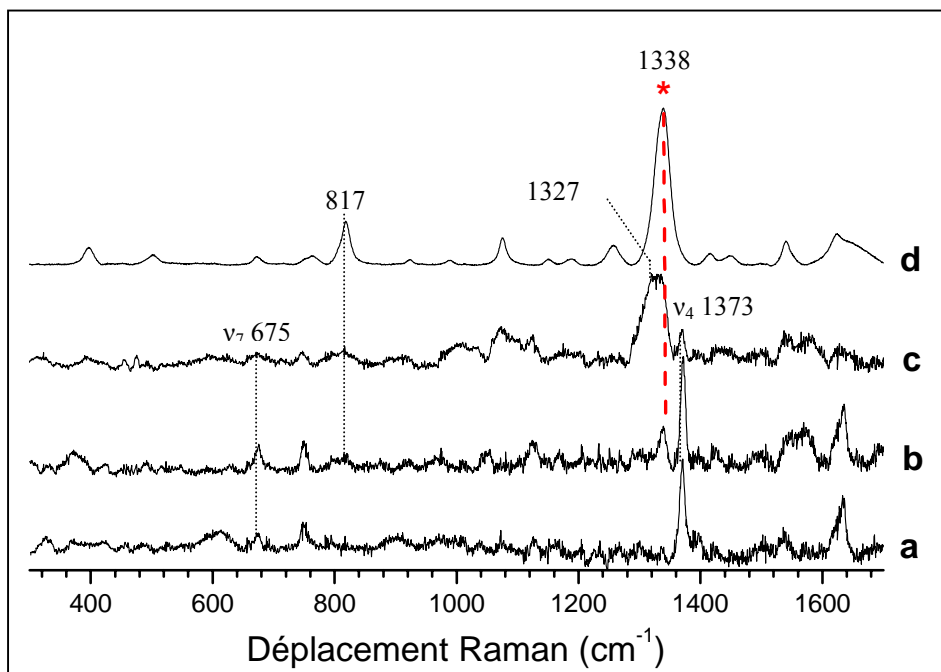


Figure III.39. Spectres Raman enregistrés à 457,9 nm, à température ambiante lors de l'analyse de a) iNOSoxy native, b) iNOSoxy plus nitrotyrosine libre en rapport stoechiométrique, c) iNOSoxy modifiée par dix additions de 4 éq. PN, d) nitrotyrosine libre.

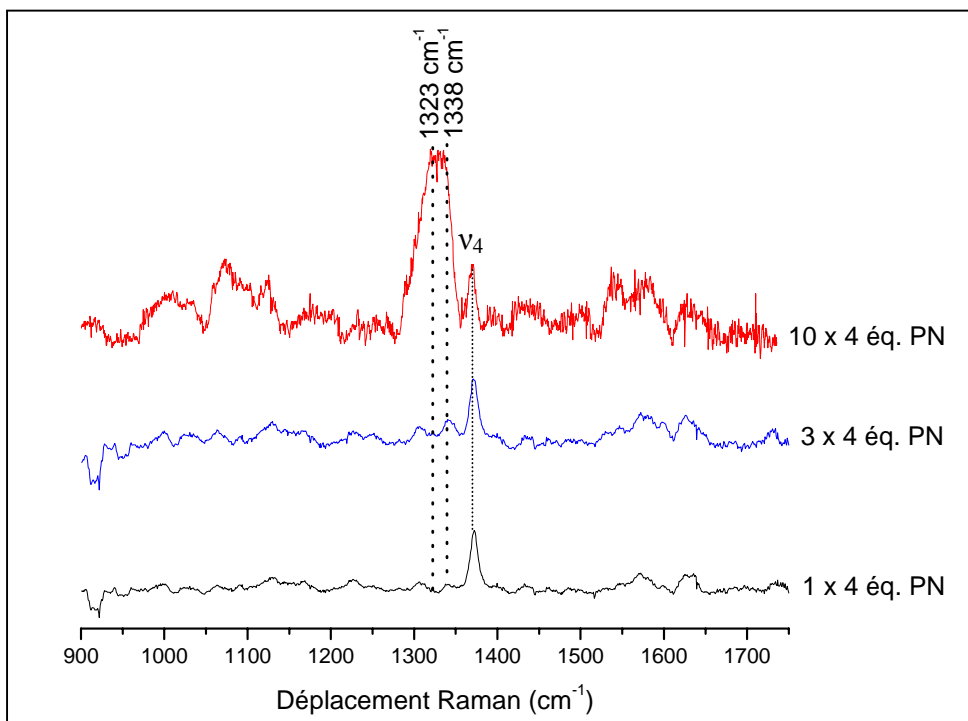


Figure III.40. Spectres Raman enregistrés à 457,9 nm, à température ambiante, lors de l'analyse de iNOSoxy modifiée par une (noir), trois (bleu), dix (rouge) additions de 4 éq. PN. Les spectres ont été normalisés sur l'intensité du pic du mode porphyrine v_7 de l'hème à 675 cm^{-1} pour comparaison.

environnement [173]. Cette étude a été réalisée avec une longueur d'onde excitatrice à 457,9 nm (voir chapitre II, 4.1.).

Dans un premier temps, un titrage du signal de la nitrotyrosine seule et en mélange stoechiométrique avec iNOSoxy native a été réalisé. La figure III.39 présente les spectres Raman obtenus. Dans nos conditions expérimentales, à pH 7,4, la bande de vibration $\nu_{\text{NO}_2, \text{S}}$, caractéristique de l'élongation symétrique du groupe nitro de la nitrotyrosine, est observée à 1338 cm^{-1} . La deuxième bande de plus forte intensité pour la nitrotyrosine correspond au mode de déformation angulaire plane du groupe nitro à 817 cm^{-1} . Le signal Raman de la nitrotyrosine n'est pas modifié en présence de iNOSoxy. En condition stoechiométrique d'enzyme et de nitrotyrosine, seule la bande du mode d'élongation à 1338 cm^{-1} est assez intense pour identifier la présence de nitrotyrosine, et le rapport d'intensité entre le mode ν_4 à 1373 cm^{-1} de iNOSoxy et $\nu_{\text{NO}_2, \text{S}}$ de la nitrotyrosine est de 2,6 (rapport d'aires = 2,5).

Un échantillon de iNOSoxy native modifiée par dix additions de 4 éq. PN a ensuite été analysé dans les mêmes conditions expérimentales. Le spectre Raman obtenu, présenté figure III.39, montre une large bande de vibration intense centrée à 1327 cm^{-1} . Un tel signal a déjà été observé par l'équipe de A. W. Munro lors de l'étude des nitrotyrosines portées par le cytochrome P450_{BM-3} par spectroscopies Raman de résonance et SERR (*Surface Enhanced Resonance Raman*) [174] et est caractéristique de nitrotyrosines dans un environnement hydrophobe. Au regard de la largeur de la bande observée pour notre échantillon protéique (46 cm^{-1} à mi-hauteur), nous suggérons l'observation d'un mélange de populations de nitrotyrosines, composé de résidus nitrotyrosines exposés au solvant (1338 cm^{-1}), et de résidus nitrotyrosines isolés du solvant (1323 cm^{-1}) car enfouis dans la structure de la protéine. La modélisation du signal Raman par une fonction de plusieurs gaussiennes donne un rapport de 0,3 entre l'aire du ν_4 de l'hème et celle du signal de la nitrotyrosine à 1338 cm^{-1} , ce qui représente huit nitrotyrosines par hème. Le même calcul avec le signal de la nitrotyrosine à 1323 cm^{-1} donne un rapport de 0,16, cette dernière information étant donnée à simple titre indicatif puisque le titrage du signal de la nitrotyrosine en milieu hydrophobe n'a pas été réalisé et que rien n'indique qu'il soit comparable à celui d'un résidu nitrotyrosine exposé au solvant.

Afin d'incrémenter le signal de détection de la nitrotyrosine, comme nous l'avons fait dans les expériences d'immuno-précipitation, nous avons préparé des échantillons iNOSoxy native modifiée par une et trois additions de 4 éq. PN. Les spectres Raman obtenus sont présentés figure III.40. Ils ont été normalisés sur l'intensité du mode porphyrine ν_7 de l'hème à 675 cm^{-1} , pour pouvoir être comparés entre eux. Le signal de la nitrotyrosine est détecté à

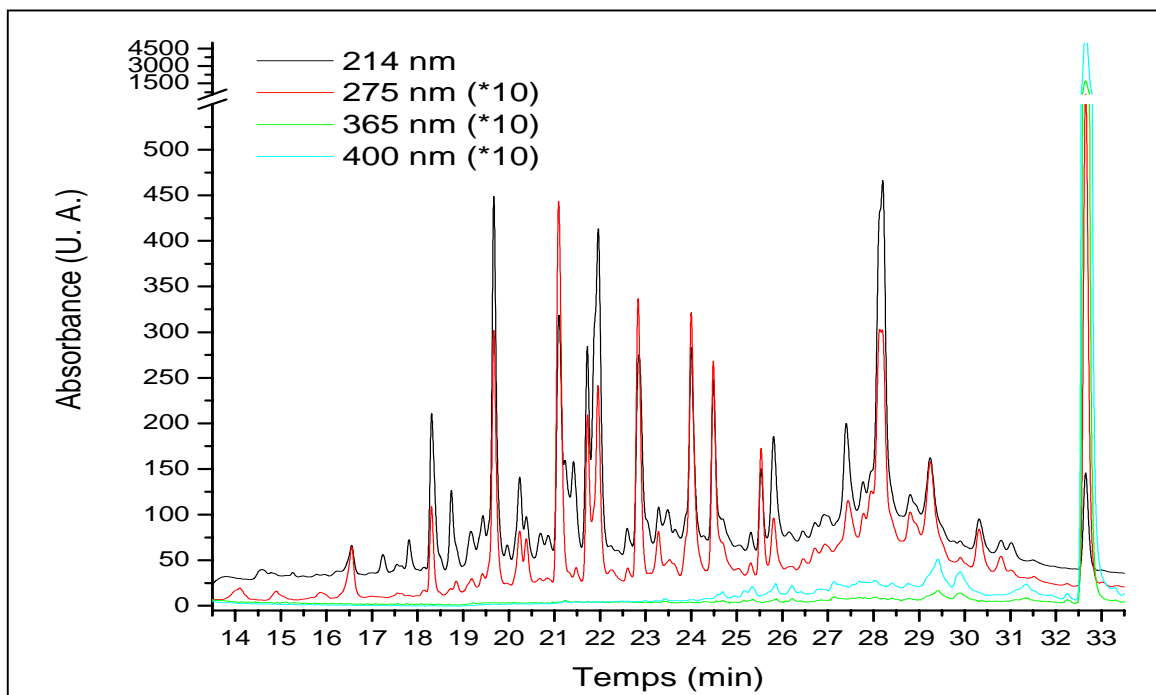


Figure III.41. Superposition des chromatogrammes enregistrés à 214 nm (noir), 275 nm (rouge), 365 nm (vert) et 400 nm (bleu) lors de l'analyse en HPLC des fragments obtenus après digestion à la trypsine de iNOSoxy native. Le pic très intense observé à 32,8 min est attribué à la porphyrine. Hormis le chromatogramme enregistré à 214 nm, tous sont multipliés x10.

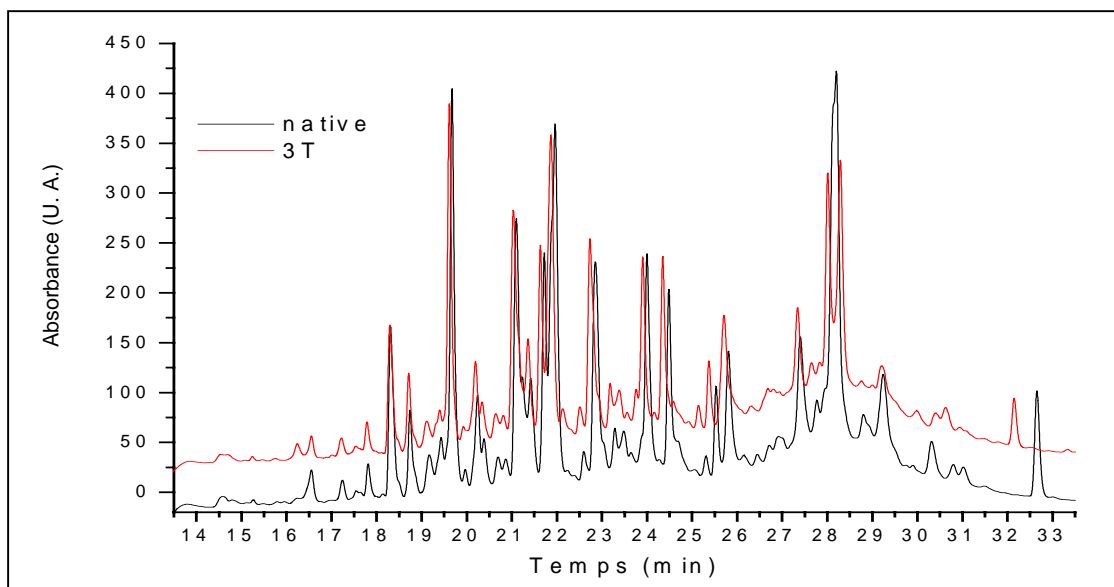


Figure III.42. Superposition des chromatogrammes enregistrés à 214 nm sur les échantillons iNOSoxy native (noir) et iNOSoxy modifiée par trois additions de 4 éq. PN (rouge), après digestion à la trypsine.

1338 cm^{-1} sur chacun des spectres Raman enregistrés avec 0,3 et 1 nitrotyrosine par hème suivant que iNOSoxy a activé une et trois additions de PN respectivement. Seul l'échantillon ayant activé trois additions de PN présente un signal vers 1320 cm^{-1} , faible (rapport d'aire de 20 avec le mode ν_4 de l'hème), ce qui suggère que c'est la nitration d'un résidu accessible au solvant qui a lieu dans un premier temps.

A priori ce type de résidu correspondrait plutôt à des tyrosines situées à la surface de la protéine. A. Daiber a proposé, dans le cas du cytochrome P450_{CAM} [147], qu'une tyrosine à la surface d'un cytochrome (A) puisse être nitrée par l'hème d'un cytochrome (B), suivant un mécanisme intermoléculaire. *A contrario*, la nitration d'un résidu enfoui dans la structure protéique, et plus proche de l'hème, se ferait suivant un mécanisme intramoléculaire. Ce scénario est tout à fait envisageable dans le cas de iNOSoxy pour laquelle ces réactions pourraient de plus être réalisées entre monomères d'un même dimère.

Par ailleurs, sur la base des travaux de L. Quaroni et W. E. Smith sur le cytochrome c [173], il serait intéressant de réaliser des expériences complémentaires afin de déterminer les valeurs de pKa des différentes tyrosines nitrées. Pour cela il suffirait d'élaborer une gamme d'échantillons de iNOSoxy qui, après réaction avec PN, seraient reconditionnés dans des solutions tampon à différentes valeurs de pH. Alors, l'observation du déplacement du signal de la nitrotyrosine de 1338 à 1323 cm^{-1} avec l'augmentation du pH pourrait permettre la construction d'une courbe de titrage du ou des résidus modifiés.

Enfin, si la spectroscopie Raman de résonance a permis la détection des résidus nitrotyrosine de la protéine, il serait intéressant de réitérer toutes ces expériences afin d'observer l'éventuelle présence de résidus nitrotryptophane. En effet, cette identification ne peut être réalisée par immuno-précipitation au laboratoire, puisque les anti-corps anti-nitrotryptophane ne sont pas disponibles commercialement.

3.2.3. Par HPLC :

Des échantillons de iNOSoxy native et modifiée par 1 - 3 - 5 - 10 additions de 4 éq. PN ont été digérés par la trypsine. La liste des 51 fragments théoriques obtenus pour une digestion efficace à 100 % est présentée annexe (2.2.). Les conditions expérimentales ont été adaptées en vue d'une analyse des peptides par chromatographie HPLC, les fragments étant séparés suivant leur différence de polarité. Les chromatogrammes ont été enregistrés à 214, 275, 365 et 400 nm (voir chapitre II, 3.2.2.2.).

La superposition des chromatogrammes enregistrés lors de l'analyse de l'échantillon iNOSoxy native après digestion à la trypsine est présentée figure III.41. A 214 nm,

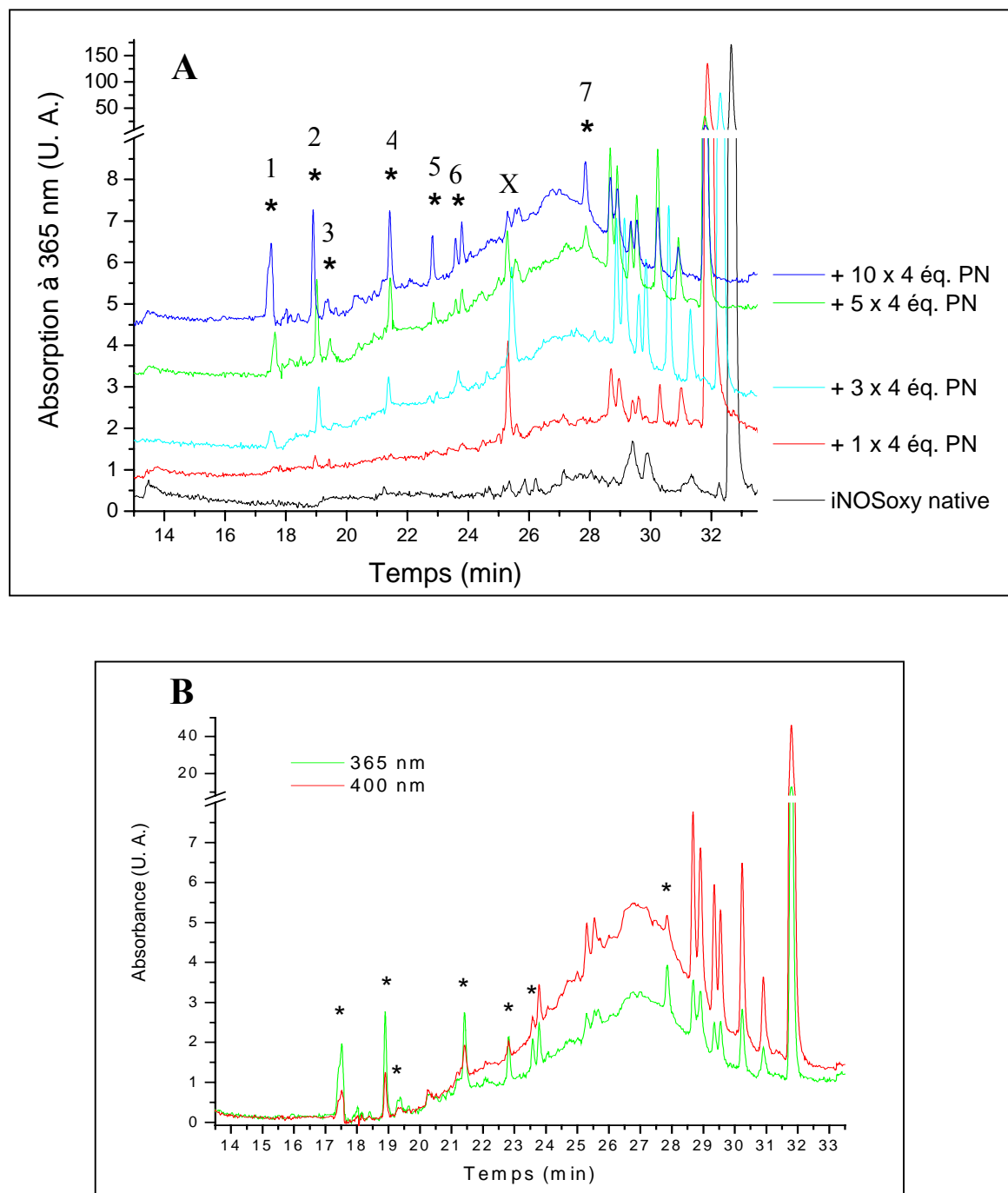


Figure III.43. A. Superposition des chromatogrammes enregistrés à 365 nm lors de l'analyse en HPLC des fragments obtenus après digestion par la trypsine de iNOSoxy native (noir), et modifiée par une (rouge), trois (cyan), cinq (vert), dix (bleu) additions de 4 éq. PN. Les pics marqués (*) présentent une absorption plus importante à 365 nm qu'à 400 nm. B. Superposition des chromatogrammes enregistrés à 365 nm (vert) et 400 nm (rouge) pour l'échantillon iNOSoxy modifiée par 10 additions de PN.

l'absorption de la liaison peptidique est majoritaire ainsi chaque pic devrait représenter un peptide issu de la digestion de iNOSoxy. Nous comptons une quarantaine de pics sur le chromatogramme enregistré à 214 nm (noir) pour iNOSoxy native. La digestion à la trypsine a donc été efficace, certains peptides devant être trop petits pour pouvoir être observés. Le pic observé à 32,8 min absorbe cinq fois plus à 400 nm qu'à 214 nm, et correspond certainement à la porphyrine, dont le maximum d'absorption est compris entre 400 et 420 nm.

Les chromatogrammes enregistrés à 214 nm pour les échantillons iNOSoxy native et modifiée par PN ont globalement un profil similaire (fig. III.42), bien que des différences de temps de rétention soient observées pour certains pics. Ceci suggère que la digestion à la trypsine n'est pas altérée par la présence de résidus modifiés sur la protéine. Certains peptides présentent désormais une absorption à 365 nm, longueur d'onde caractéristique de la présence de résidus nitrotyrosine ou nitrotryptophane, en milieu acide [175]. La figure III.43-A présente la superposition des chromatogrammes enregistrés à 365 nm lors de l'analyse des échantillons iNOSoxy native (spectre noir) et modifiée par 1, 3, 5, et 10 additions de 4 éq. PN (autres spectres). Les pics marqués par une étoile (*) présentent une absorption maximale à 365 nm alors que les autres ont une absorption plus importante à 400 nm (fig. III.43-B). Ainsi, deux zones se distinguent sur les chromatogrammes : la première se situe entre 13 et 28,5 min, la seconde entre 28,5 et 33 min.

Les pics observés entre 28,5 et 33 min, absorbent tous plus à 400 nm qu'à 365 nm. Ceci suggère qu'ils puissent correspondre à des pics de porphyrine, seule ou liée de manière covalente à un peptide. Tous les chromatogrammes des échantillons iNOSoxy modifiée par PN présentent des pics supplémentaires dans cette zone. Ainsi, les modifications induites par l'activation du PN affecteraient dans un premier temps la porphyrine ou des peptides liés de manière covalente à celle-ci. Cependant seul l'enregistrement des spectres d'absorption UV-visible associés à ces pics pourrait valider cette hypothèse.

Entre 13 et 28,5 min, aucun pic n'est observé sur le chromatogramme de iNOSoxy native à 365 nm. Après une addition de 4 éq. PN, un pic apparaît à 25,3 min. Cependant ce pic a une absorption plus importante à 400 nm, ce qui suggère qu'il ne s'agisse pas d'un simple peptide portant un résidu tyrosine ou tryptophane nitré. A trois additions de PN, quatre autres pics apparaissent à 17,5 - 19,1 - 21,4 et 23,7 min avec une absorption maximale à 365 nm. A partir de cinq additions de PN les chromatogrammes enregistrés à 365 nm sont tous identiques et présentent sept pics avec un maximum d'absorption à 365 nm. Nous suggérons que ces sept pics correspondent à des peptides portant des résidus nitrotyrosine ou nitrotryptophane.

Masses détectées	Peptides	Coupures manquées	Tyrosines nitrées	Additions de PN	Fractions collectées (*)
1022,43	⁴⁴⁰ HMQNEYR	0	Y445	2-3-5	1, 2
1112,55	¹¹ VKSYQSDLK	1	Y14	4-5	2, 7
1137,55	³⁸³ YNILEEVGR	0	Y383	3-5	5
1293,65	³⁸³ YNILEEVGRR	1	Y383	2-3-5	1
1498,76	¹¹ VKSYQSDLKEEK	2	Y14	2-3-4-5	6, X
1501,79	⁶⁹ LHVTSTRPQYVR	0	Y78	3	2
1647,87	⁷ FLFKVKSYQSDLK	2	Y14	4	6

Table III.9. Peptides portant un résidu nitrotyrosine identifiés par analyse en spectrométrie de masse (MADI-TOF) des fractions collectées en sortie de colonne HPLC pour les échantillons de iNOSoxy native modifiée par 2 - 3 - 4 - 5 additions de 4 éq. PN.

iNOSoxy comporte 18 tyrosines et 11 tryptophanes dans sa séquence peptidique. Après digestion totale par la trypsine, ces résidus devraient être répartis sur 20 fragments. Seuls sept pics sont observés pour potentiellement être porteurs de telles modifications ce qui suggère que l'activation du PN n'aurait pas pour conséquence une nitration massive et aspécifique de la protéine.

3.2.4. Par spectrométrie de masse :

L'identification des résidus nitrés (tyrosine, tryptophane) peut s'effectuer par spectrométrie de masse. Cette technique est bien décrite dans la littérature et notamment pour l'identification des nitrotyrosines portées par les cytochromes P450_{CAM} et P450_{BM-3} après réaction avec PN [144, 147].

Différentes techniques de spectrométrie de masse ont été utilisées, en collaboration avec le service de neurobiologie et diversité cellulaire de l'ESPCI, pour identifier les modifications de iNOSoxy après activation de plusieurs excès de PN (voir chapitre II, 3.2.2.3.).

Tout d'abord les peptides présentant une absorption à 365 nm ont été collectés par fractions en sortie de colonne HPLC. Ces fractions ont été déposées sur une plaque d'analyse MALDI-TOF et mélangées à une matrice α -cyano pour analyse. Les résultats ont été comparés à une banque de données élaborée à partir de la séquence de iNOSoxy. Sept peptides de iNOSoxy ont été identifiés pour être porteurs d'un résidu nitrotyrosine et sont présentés table III.9. Les tyrosines nitrées qui leur sont associées sont les résidus Y14, Y78, Y383 et Y445, tous situés à la surface de la protéine. Les expériences menées par spectroscopie Raman de résonance ayant indiqué la présence de résidus nitrotyrosine enfouis dans la structure protéique (voir 3.2.2.), il semble que tous les résidus nitrotyrosine nitrés n'aient pas été détectés. De plus, si ces fragments ont été détectés sans ambiguïté, il est impossible de les associer à un pic du chromatogramme HPLC. Par exemple, le pic 1 pourrait correspondre à Y383 ou à Y445, sans distinction possible. Ceci indique que les fractions collectées en sortie de colonne HPLC ont couvert une trop large gamme du chromatogramme. Pour remédier à ce problème, il faudrait coupler l'analyse par absorption d'un dispositif nano-LC à une mesure directe de la masse des peptides ainsi détectés.

Puisque les modifications de iNOSoxy ne se restreignent *a priori* pas à de simples nitrations de résidus aromatiques, nous avons voulu mesurer la masse globale de la protéine, avant et après activation de PN, avec un spectromètre de masse FTICR équipé d'une source nanospray. La différence de masse ainsi calculée pourrait nous renseigner sur le type et le nombre de modifications portées par la protéine. Après avoir essayé différentes conditions

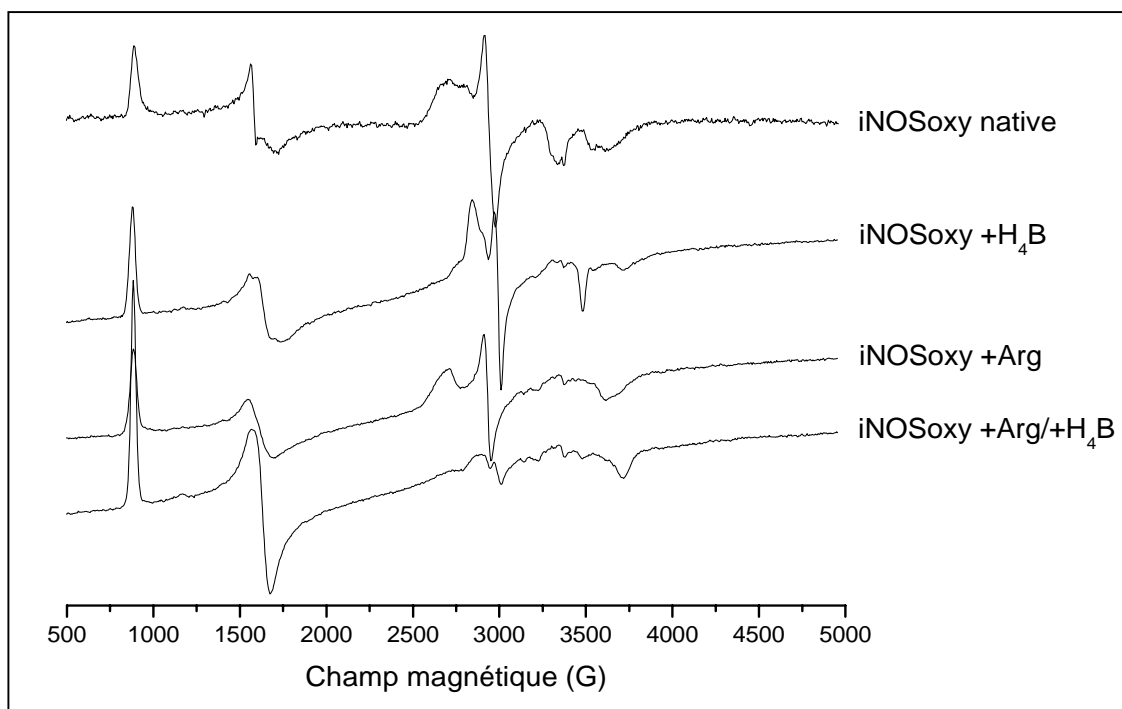


Figure III.44. Spectres RPE enregistrés à 15 K sur des échantillons de iNOSoxy native, puis en conditions saturantes de H₄B, Arg, Arg et H₄B, dans HEPES 0,1 M pH 7,4.

expérimentales (nature du solvant, de l'acide, dessalage de l'échantillon), nous avons réussi à obtenir le spectre FTMS d'une protéine de masse moléculaire comprise entre 22 et 23 kDa (spectre non présenté), ce qui ne correspond pas à iNOSoxy et témoigne de la non pureté à 100 % de nos échantillons. Il est important ici de souligner que la détection préférentielle d'une protéine plutôt qu'une autre ne dépend en aucun cas de sa concentration en solution, mais uniquement de ses propriétés d'ionisation.

Ainsi les résultats obtenus par MALDI-TOF sur les échantillons de iNOSoxy (native et modifiée) ont été comparés à une banque de données téléchargée sur Uniprot-SwissProt. Cette opération a permis de mettre en évidence, dans nos échantillons de iNOSoxy, la présence de diverses protéines provenant de la souche bactérienne *E. coli*, dont par exemple le récepteur cAMP (CRP_ECO57) de masse moléculaire comprise entre 22 et 23 kDa et qui pourrait correspondre à la protéine détectée par FTICR. iNOSoxy ayant été surexprimée dans *E. coli*, il n'est pas étonnant de détecter par spectrométrie de masse certaines de ses protéines et ce malgré les multiples étapes de purification de nos solutions protéiques.

3.3. Mise en évidence de la dégradation progressive de iNOSoxy :

Le déplacement de la bande de Soret à 411 nm observé en spectroscopie d'absorption UV-visible au cours de la modification de iNOSoxy par PN ne semble pas être assez significatif pour refléter une transition partielle vers un état HS (395 nm). Cependant, l'apparition d'une bande d'absorption à 624 nm pourrait correspondre à un déplacement de la bande de transfert de charge normalement observée à 650 nm. Cette bande apparaît pour les espèces HS ayant partiellement ou totalement perdu le sixième ligand H₂O. Ainsi dans un premier temps, les différents complexes Fe^{III} de iNOSoxy ont été caractérisés par spectroscopie RPE, dans nos conditions expérimentales. Ensuite, nous avons analysé différents échantillons de iNOSoxy modifiée, par PN et H₂O₂, pour obtenir une information non ambiguë sur l'état de spin de l'hème, en supposant que la congélation des échantillons n'induit aucun changement d'état.

3.3.1. Caractérisation des espèces Fe^{III} de iNOSoxy :

Le spectre RPE de iNOSoxy native, soit telle qu'elle est obtenue en fin de purification, est présenté figure III.44. Comme l'avait observé l'équipe de J. C. Salerno [176], il montre un mélange d'espèces Fe^{III} de propriétés de spin différentes. L'un des signaux RPE est celui d'une espèce Fe^{III} Bas Spin (BS). Son tenseur g présente trois composantes, ce qui est caractéristique d'un système à géométrie rhombique. L'autre signal RPE est celui d'une

iNOSoxy Fe ^{III}	Soret (nm)	HS				BS			Remarques
		g _y	g _x	g _z	E/D	g ₃	g ₂	g ₁	
Native	420	7,58	4,19	1,86	0,07	2,48	2,29	2,02	
+ Arg	397 / 420	7,58	4,19	1,86	0,07	2,48	2,30	n. d.	BS native
+ H ₄ B	397	7,62	4,16	1,81	0,07	2,45 2,36	2,30	n. d. 1,93	g _x ≈ 4,3 BS {Fe ^{III} + DTT}
+ Arg / + H ₄ B	397	7,58	4,14	1,81	0,07	2,32	2,25	1,93	BS {Fe ^{III} + DTT}
+ DTT		-	-	-	-	2,36	2,25	1,93	
+ Imidazole	428	-	-	-	-	2,50	2,30	1,87	
1 x 4 éq. PN	420	7,54	4,24	n. d.	0,07	2,47	2,28	1,91	6 - 2 (E/D = 0)
4 x 4 éq. PN	416	7,11	4,27	n. d.	0,05	2,47	2,27	1,91	6 - 2 (E/D = 0)
10 x 4 éq. PN	410	7,04	4,27	n. d.	0,04	2,47	2,27	1,92	6 - 2 (E/D = 0)
PN décomposé		-	4,28	-	-	2,49	2,28	1,91	
5 x 10 éq. H ₂ O ₂	412	7,11	4,27	n. d.	0,05	2,47	2,28	1,91	6 - 2 (E/D = 0)
5 x 10 éq. H ₂ O ₂ + NO ₂ ⁻	410	7,15	4,27	n. d.	0,05	2,48	2,27	1,92	6 - 2 (E/D = 0)

Table III.10. Valeurs des composantes du tenseur g relevées sur les spectres RPE enregistrés à 4 et 15 K pour les différents complexes Fe^{III} de iNOSoxy étudiés dans HEPES 0,1 M pH 7,4.

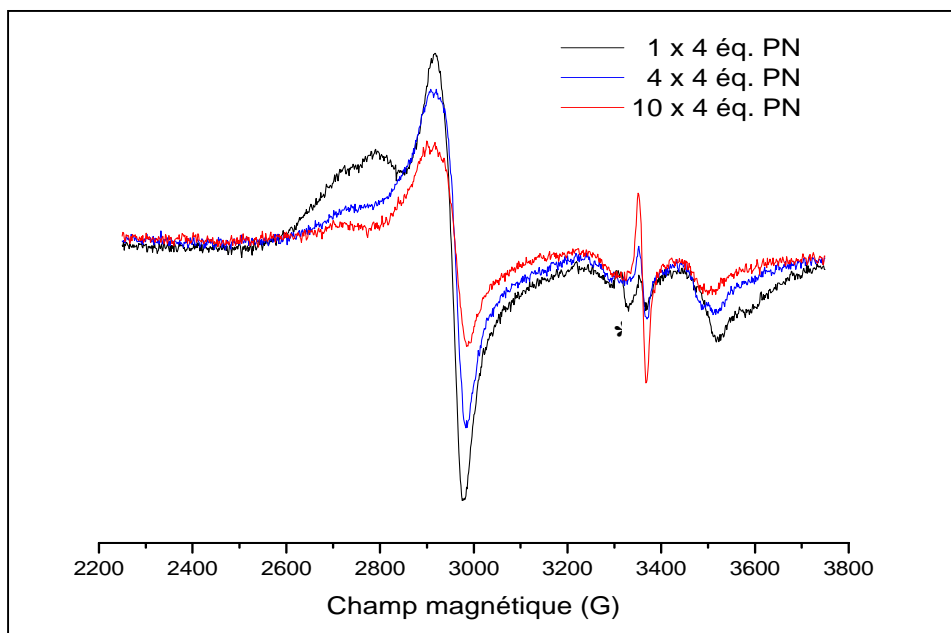


Figure III.45. Spectres RPE enregistrés à 15 K sur des échantillons de iNOSoxy modifiée par une (noir), quatre (bleu), dix (rouge) additions de 4 éq. PN. Tous les échantillons sont conditionnés dans HEPES 0,1 M pH 7,4 pour l'analyse RPE. Seul le signal de l'espèce BS est présenté. Le signal d'un radical a été observé sur le spectre RPE de l'échantillon de iNOSoxy modifié par 1 x 4 éq. PN (*); il doit s'agir d'un contaminant puisqu'il n'a pas été observé lorsque l'expérience a été reproduite.

espèce Fe^{III} rhombique Haut Spin (HS). En condition saturante de substrat Arg ou de co-facteur H_4B , la contribution de l'espèce HS augmente, au détriment de celle de l'espèce BS. Par ailleurs, lorsque Arg et H_4B sont présents simultanément, iNOSoxy est 100 % Fe^{III} HS. Les valeurs du tenseur g pour chaque espèce et pour chaque condition sont reportées table III.10.

En présence de Arg, le signal BS persistant correspond à l'espèce BS observée pour iNOSoxy native. Le spectre d'absorption UV-visible enregistré au préalable présentait un épaulement à 420 nm ce qui indique qu'une partie de iNOSoxy native n'avait soit pas fixé Arg, soit pas réalisé la transition $\text{BS} \rightarrow \text{HS}$. En effet, seul, le substrat induit difficilement le changement d'état de spin du fer, l'efficacité de cette transition étant variable d'une préparation protéique à l'autre.

Le signal BS persistant en condition $+\text{H}_4\text{B}$ est moins anisotrope que le signal BS de l'espèce native. Ceci indique que la quasi-totalité de iNOSoxy a fixé le co-facteur, mais que sa présence ne suffit pas à induire 100 % de transition de spin. Il existerait donc une espèce iNOSoxy $+\text{H}_4\text{B}$ BS. Ceci pourrait s'expliquer par un maintien de la molécule d'eau en sixième ligand, ce que nous étudierons plus loin par spectroélectrochimie (voir chapitre IV, 1.1.2.3.). De plus, nous remarquons deux composantes avec $g \approx 4,2$, ce qui témoigne de l'existence de deux formes HS. Puisque aucune autre transition ne semble associée à cette deuxième valeur de g, nous suggérons que cet échantillon puisse contenir des traces de fer, Fe^{III} , non spécifique ($g = 4,3$) [177]. Le spectre d'absorption de ce mélange d'espèces présentait un maximum d'absorption centré à 397 nm, sans épaulement.

D'autres échantillons ont été préparés pour tenter d'identifier les complexes minoritaires apparaissant sur les spectres, comme les complexes $\{\text{Fe}^{\text{III}} + \text{DTT}\}$ ou $\{\text{Fe}^{\text{III}} + \text{imidazole}\}$. Ces spectres ne sont pas présentés mais les valeurs relevées pour les composantes du tenseur g sont reportées table III.10.

3.3.2. Caractérisation de iNOSoxy modifiée :

Les figures III.45 et III.46 présentent les spectres RPE enregistrés à 15 et 4 K, sur une gamme d'échantillons de iNOSoxy native modifiée par 1, 4 et 10 activations successives de 4 éq. PN. L'effet du PN sur iNOSoxy a été suivi par spectroscopie d'absorption UV-visible et reproduit les résultats obtenus précédemment (voir 3.1.1.). Tous les échantillons ont été conditionnés, après modification par PN, dans un tampon HEPES 0,1 M pH 7,4 et ramenés à la même concentration initiale en hème. Le spectre RPE de ces échantillons présente, comme celui de iNOSoxy native, un mélange d'espèces BS et HS. Les trois composantes du tenseur g

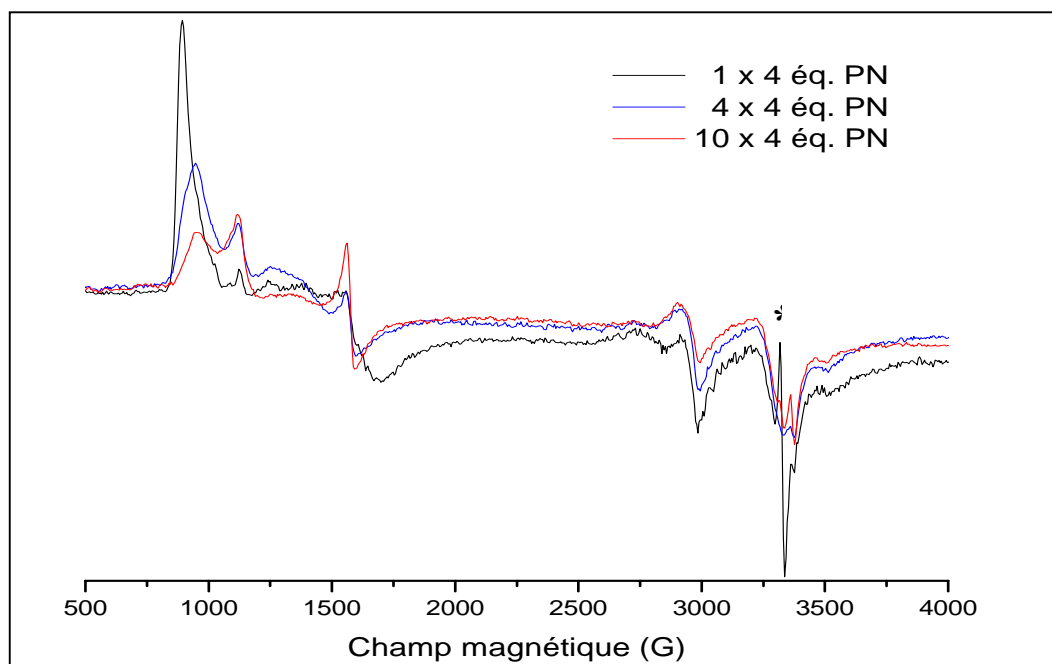


Figure III.46. Spectres RPE enregistrés à 4 K sur des échantillons de iNOSoxy modifiée par une (noir), quatre (bleu), dix (rouge) additions de 4 éq. PN. Le signal d'un radical a été observé sur le spectre RPE de l'échantillon de iNOSoxy modifié par une addition de PN (*); il doit s'agir d'un contaminant puisqu'il n'a pas été observé lorsque l'expérience a été reproduite.

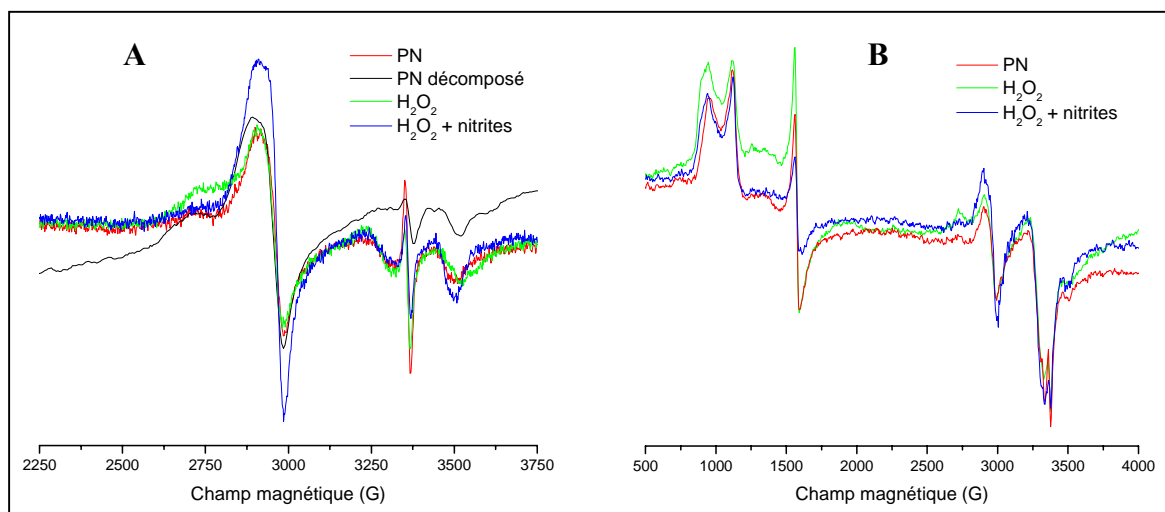


Figure III.47. Spectres RPE enregistrés à partir des échantillons témoins de la réaction d'oxydation de iNOSoxy par PN. iNOSoxy a été modifiée par PN (rouge), PN décomposé (noir), H_2O_2 (vert), H_2O_2 plus NO_2^- (noir). **A)** Signal de l'espèce BS (15 K). **B)** Signal de l'espèce HS (4 K).

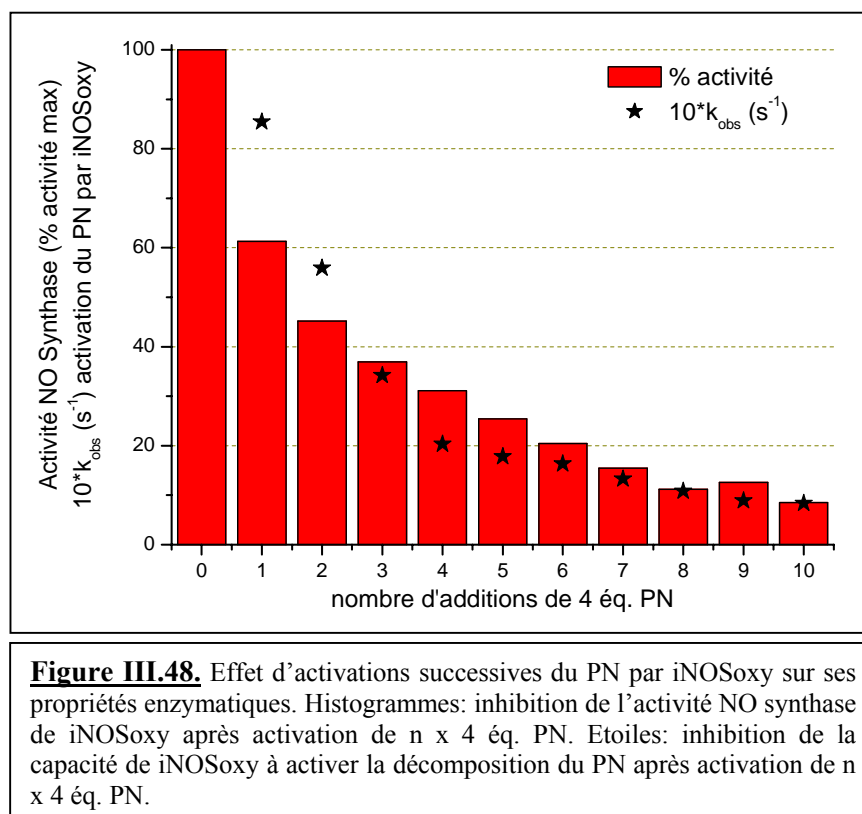
de l'espèce BS ne semblent pas évoluer au fil des additions de PN (fig. III.45). Par contre, le signal de l'espèce BS diminue significativement avec le nombre d'additions de PN activé par iNOSoxy. Cette disparition semble accompagnée de l'apparition d'un faible signal, plus fin, probablement BS, et à la géométrie parfaitement axiale à $g = 1,998$.

A 4 K, l'observation de la composante HS du signal RPE est favorisée (fig. III.46). Il semble que l'espèce Fe^{III} HS initialement observée sur le spectre de iNOSoxy native disparaisse progressivement au profit de la formation d'une nouvelle espèce HS. Cette dernière ne ressemble à aucune des espèces observées sur les complexes Fe^{III} HS de iNOSoxy en présence de combinaisons de substrat et de co-facteur. Les valeurs des composantes de son tenseur g sont présentées table III.10.

A 4 K, le faible signal observé à $g = 1,998$ n'est pas exalté, ce qui renforce l'hypothèse d'une espèce BS. Ce signal pourrait correspondre à la formation d'un radical organique stable au sein de la protéine, par exemple un radical thiyle créé par oxydation et décooordination du ligand cystéine proximal. De même, le signal HS observé à $g = 6$ et 2 pourrait correspondre à une fraction HS de l'enzyme qui aurait perdu la cystéine proximale et adopterait alors une géométrie purement axiale [178]. Le signal HS observé à $g = 7,1$ pourrait représenter un état de faible coordination du ligand thiolate ou encore rendre compte de la présence d'un ligand faible (nitrite) sur le fer ce qui pourrait expliquer l'élargissement du signal. Quant au signal à $g = 4,3$, il semble caractéristique du fer libre, totalement décoordiné de l'hème [177]. Cependant, après traitement au PN, les échantillons ont été exhaustivement rincés par un tampon HEPES, ainsi il est presque improbable qu'ils puissent contenir du fer libre en solution. Nous suggérons alors que, si le fer s'est décoordiné sous l'effet d'un trop fort excès de PN, il reste attaché de quelque manière à la structure protéique.

Différents mimes de la réaction d'oxydation de iNOSoxy par PN ont également été analysés en spectroscopie RPE. La figure III.47 présente les spectres RPE enregistrés à 15 et 4 K lorsque iNOSoxy a été modifiée par PN décomposé et H_2O_2 (en absence et en présence de nitrites). Tous ces échantillons présentent, qualitativement, les mêmes caractéristiques que ceux de iNOSoxy modifiée par PN. Les valeurs de g sont également reportées table III.10.

L'ensemble de ces résultats confirme que les modifications observées en spectroscopie d'absorption UV-visible correspondraient à une ou plusieurs oxydations de iNOSoxy induisant la décooordination progressive du ligand thiolate proximal et, à terme, la probable libération du fer. Ainsi la spectroscopie RPE nous permet de mettre en évidence la formation d'une nouvelle espèce HS, qui pourrait correspondre à un fer hémique sans ligand cystéine proximal, 5 ou 6-coordiné avec une ou deux molécules d'eau, et dont la bande de transfert de



charge pourrait absorber à 624 nm. Nous avons mis en évidence qu'une faible fraction de iNOSoxy se dégrade progressivement. Par contre, la géométrie de l'espèce Fe^{III} BS, *a priori* responsable de l'activation du PN, persiste et reste inchangée.

3.4. Activité de iNOSoxy après activation du PN :

L'activation de PN par iNOSoxy induit différentes modifications structurales de la protéine. Différentes techniques spectroscopiques et biochimiques ont mis en évidence la nitration et l'oxydation de résidus acides aminés dans l'environnement de l'hème, dont la cystéine proximale. La nitration de résidus tyrosine au sein d'une protéine peut cependant induire tant un gain de fonction, ou *in vivo* l'adressage d'un signal (cytochrome c, fibrinogène, protéine kinase C_ϵ), qu'une perte d'activité (MnSOD, cytochrome P450_{CAM}) [26, 169]. Ainsi, nous avons étudié l'activité de iNOSoxy après réaction avec PN.

3.4.1. Activité NO synthase :

Nous avons réalisé une gamme d'échantillons de iNOSoxy native modifiée par n additions de 4 éq. PN. Les échantillons ont été débarrassés des produits de décomposition du PN et reconditionnés dans KPi 0,1 M pH 7,4. L'activité NO synthase a été mesurée pour chaque échantillon par le test de Griess. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité mesurée pour iNOSoxy native et présentés sous forme d'histogrammes figure III.48. Une perte progressive de l'activité NO synthase de iNOSoxy est observée au fil des additions de PN. Ainsi, plus iNOSoxy a activé de PN, moins elle est capable par la suite de synthétiser du NO. Par ailleurs, aucune inhibition n'a été observée pour la gamme d'échantillons iNOSoxy + Arg/+H₄B traitée de la même manière par PN. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de iNOSoxy est directement corrélée à l'activation du PN au site catalytique de l'enzyme et, en conséquence, aux modifications (oxydation/nitration) intervenant sur l'enzyme.

D'autres conditions d'activation du PN par iNOSoxy native ont été testées (résultats non présentés). Lorsque 1 et 2 éq. PN par addition ont été utilisés, aucune inhibition de iNOSoxy n'a été observée, même après dix additions. A 10 éq. PN par addition, l'inhibition de iNOSoxy est totale dès la première addition de PN. Ainsi ces résultats suggèrent que l'activation d'un excès de PN est responsable de l'inhibition de l'enzyme.

Dans le cas de la réaction du PN avec le cytochrome $\text{P450}_{\text{BM-3}}$, A. Daiber avait mis en évidence la nitration auto-catalytique d'un résidu tyrosine du canal d'accès du substrat à l'hème [144]. Les auteurs avaient alors proposé que cette modification puisse être impliquée

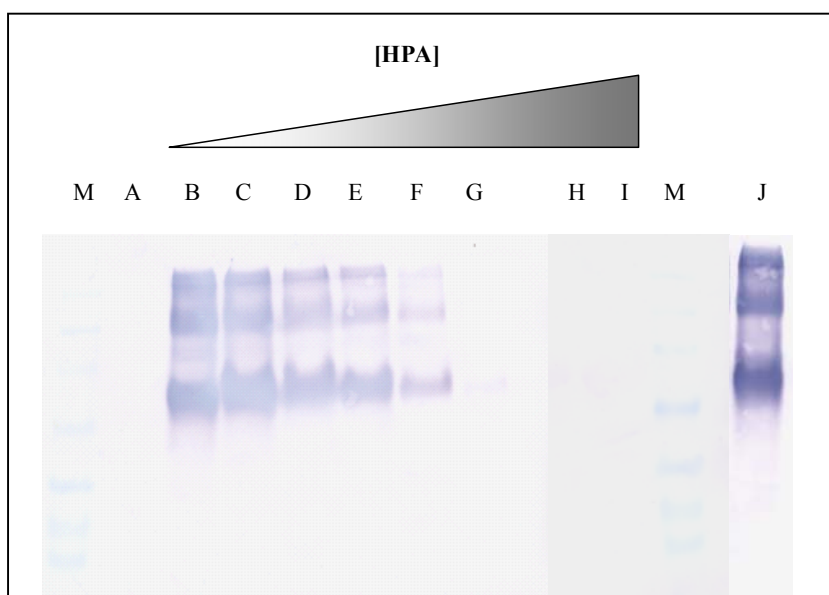


Figure III.49. Photo des membranes d'immuno-précipitation révélant la présence de résidus nitrotyrosine sur A) iNOSoxy native, puis modifiée par huit additions de 4 éq. PN en présence de HPA B) 15 μ M, C) 30 μ M, D) 60 μ M, E) 120 μ M, F) 240 μ M, G) 480 μ M, H) 960 μ M, I) 1,92 mM. Les puits notés (M) correspondent à la migration du marqueur de poids moléculaire. Le puits noté (J) correspond au témoin iNOSoxy modifiée par PN en absence de HPA.

dans la perte d'activité du cytochrome, le groupe nitro empêchant l'accessibilité du substrat à l'hème. Compte tenu du fait que iNOSoxy modifiée par PN semble incapable de fixer le substrat Arg ou le co-facteur H₄B (voir 3.1.2.), le même cas de figure est tout à fait envisageable, par nitration des résidus Tyr485 ou Trp84.

Par ailleurs, l'altération de la cystéine proximale reste le premier argument pour justifier la perte d'activité catalytique de l'enzyme.

3.4.2. Activation du PN :

Si l'enzyme perd sa capacité à synthétiser du NO au cours d'additions successives d'un excès de PN, est-elle toujours à même d'activer la décomposition du PN ? Pour répondre à cette question nous avons suivi l'évolution des cinétiques de décomposition du PN à 302 nm par iNOSoxy pour chaque addition de PN (4 éq.). La figure III.48 (étoiles) montre une diminution progressive de la constante de vitesse de décomposition du PN entre chaque addition. Les cinétiques de décomposition du PN sont cependant toujours modélisées par une fonction mono-exponentielle, ce qui suggère que l'inactivation de iNOSoxy n'a pas lieu dans la gamme de temps correspondant à la complète disparition du PN. Cette observation est du reste en accord avec le fait que les modifications du spectre d'absorption de l'enzyme interviennent après activation de tout le PN (voir 2.2.). Enfin, cette diminution progressive de la capacité à activer PN semble corrélée à la perte d'activité NO synthase de iNOSoxy.

Si les modifications intervenant sur iNOSoxy après activation du PN (oxydation/nitration) sont liées au devenir de la paire $\{\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O} + \cdot\text{NO}_2\}$, alors la présence de cibles dans le milieu, tel que HPA, pourrait peut être protéger l'enzyme. Autrement dit la question qui se pose est : quelle est la cible préférentielle de l'activité d'oxydation ou de nitration du système $\{\text{iNOSoxy} + \text{PN}\}$, l'enzyme elle-même ou les biomolécules du milieu ?

3.4.3. Protection de iNOSoxy par la présence de cibles :

Nous avons répété l'expérience de modification de iNOSoxy par huit additions de 4 éq. PN en présence de quantités croissantes de HPA dans le milieu. Tout d'abord, par spectroscopie d'absorption UV-visible, aucune modification du spectre de iNOSoxy n'a été observée. Par immuno-précipitation, il semble que la quantité de nitrotyrosines détectées sur iNOSoxy diminue avec la concentration de HPA dans le milieu (fig. III.49). En effet, à 2 mM HPA dans le milieu, aucune trace de nitration n'est détectée sur iNOSoxy (puits I). HPA semble donc protéger iNOSoxy de la nitration.

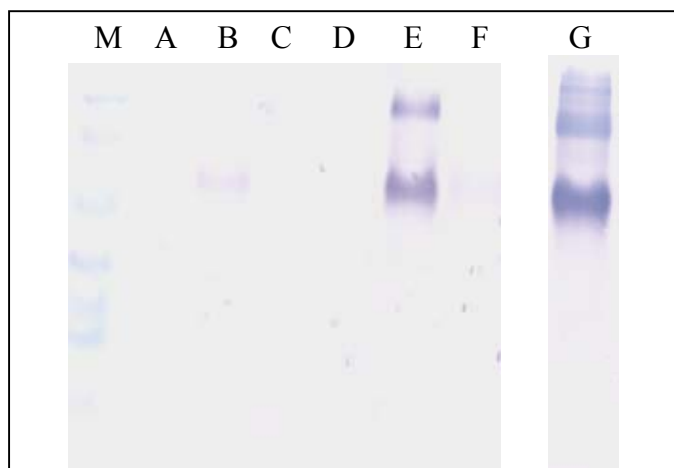


Figure III.50. Photo des membranes d'immunoprécipitation révélant la présence de résidus nitrotyrosine sur A) iNOSoxy native, puis modifiée par huit additions de 4 éq. PN en présence de B) 500 μ M HPA, C) 2 mM HPA, D) 10 mM HPA, E) 15 μ M lysozyme, F) 500 μ M lysozyme. Le puits noté (M) correspond à la migration du marqueur de poids moléculaire. Le puits noté (G) correspond au témoin iNOSoxy modifiée par PN en absence de cible.

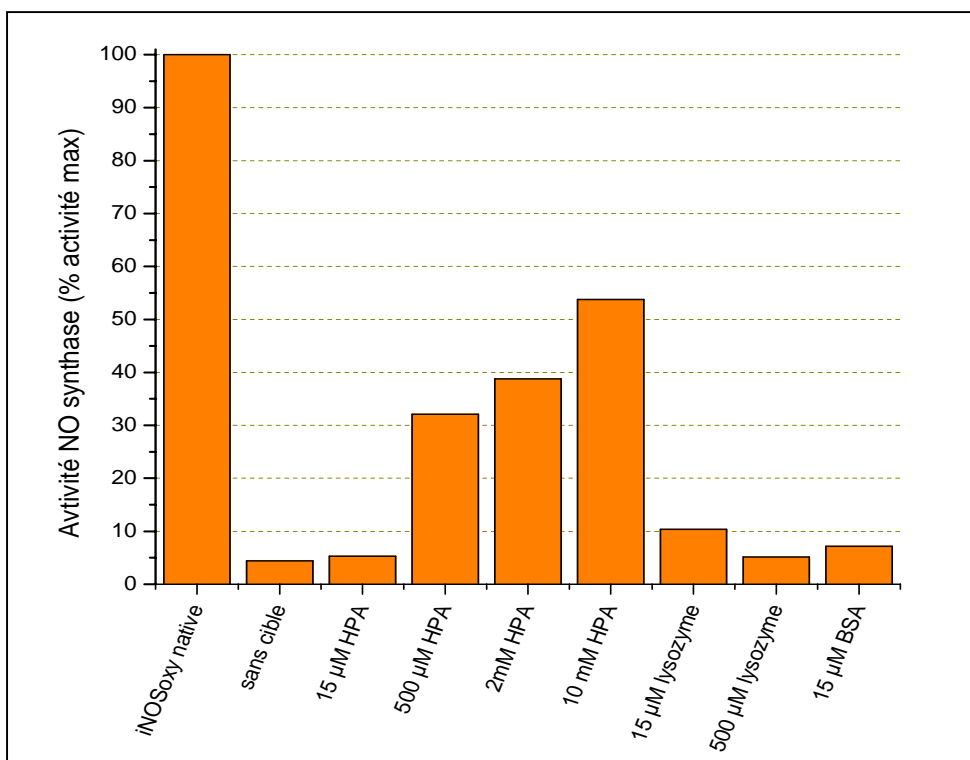


Figure III.51. Effet de la présence de cibles dans le milieu, lors de 8 activations successives de 4 éq. PN par iNOSoxy, sur l'activité NO synthase de iNOSoxy native.

L'expérience a été réitérée en présence cette fois de lysozyme, petite protéine de 14 kDa portant trois résidus tyrosine. La figure III.50 indique que le lysozyme semble également protéger iNOSoxy de la nitration.

L'activité NO synthase de tous ces échantillons a ensuite été mesurée par le test de Griess. Un échantillon de iNOSoxy ayant activé PN en présence d'une cible protéique de plus gros poids moléculaire, l'albumine de sérum de bovin (BSA), a été ajouté. Les résultats sont présentés figure III.51. Une forte concentration de HPA, supérieure à 2 mM, permet de maintenir 50 % de l'activité NO synthase. En deçà de 500 μ M HPA, ou pour les cibles protéiques de plus grande taille, nous n'observons pas de protection significative de l'activité NO synthase de iNOSoxy après huit additions de 4 éq. PN.

Il semble donc que la nitration auto-catalytique de iNOSoxy sur des résidus tyrosine ne justifie pas à elle seule la perte d'activité de l'enzyme. Nous proposons alors que l'oxydation de résidus clefs de la protéine, et en particulier de la cystéine proximale, soit plus directement responsable de la perte d'activité de iNOSoxy.

3.5. Discussion et perspectives :

Nous avons précédemment proposé que iNOSoxy puisse être source de toxicité par réaction avec PN et génération d'un système permettant l'oxydation et la nitration de composés aromatiques, portés par des petites molécules ou des petits peptides du milieu extérieur. Cependant, deux cas de figure relatifs au rapport de concentrations entre PN et iNOSoxy peuvent être envisagés.

Le premier cas de figure, suivant lequel notre étude est principalement orientée, repose sur l'hypothèse de biosynthèse de PN au site actif des NOSs, *via* la réaction d'oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$. PN serait alors synthétisé dans un strict rapport de stoechiométrie avec iNOSoxy et plusieurs éléments nous permettent de penser que l'étape d'activation du PN qui s'ensuit régénère l'enzyme dans son état de coordination natif. En effet, lorsque la réaction {iNOSoxy + PN} a été menée en conditions stoechiométriques de concentration, nous n'avons observé ni modification du spectre d'absorption, ni altération de l'activité enzymatique de iNOSoxy.

Le second cas de figure, lui, rend compte de l'hypothèse de synthèse non contrôlée de PN, par réaction de NO avec un anion superoxyde, pouvant intervenir en conditions de fort stress oxydant et en particulier au sein des macrophages où est induite l'expression de iNOSoxy. Dans ces conditions, fort est à penser que PN se trouverait en excès de concentration par

rapport à iNOSoxy. Alors, si iNOSoxy peut dans un premier temps augmenter la toxicité du PN, nos résultats suggèrent que dans un second temps, face à une trop forte concentration de PN, iNOSoxy puisse emprunter une voie suicide, supprimant alors la biosynthèse de NO, ce qui pourrait constituer un système de régulation de la toxicité des NOSs. Suivant cette hypothèse, l'étude des modifications intervenant sur iNOSoxy nous a permis de proposer l'existence de différents phénomènes qui pourraient chacun contribuer à l'inhibition de l'enzyme.

Tout d'abord nous avons mis en évidence une réaction d'oxydation auto-catalytique de iNOSoxy, reconnaissable par la modification du spectre d'absorption UV-visible de l'enzyme. Différentes expériences nous ont permis de proposer une oxydation du ligand cystéine proximal, qui suffirait à elle seule à éteindre toute activité enzymatique. Par ailleurs, la protéine possède d'autres groupes thiol également susceptibles d'être oxydés, comme par exemple, le *cluster* formé autour de l'atome de zinc à l'interface du dimère des NOSs. En effet, si les thiols sont dans un état d'oxydation qui ne permet pas la structuration de la protéine en dimère, aucune activité NO synthase ne pourra être mesurée.

Pour toutes ces réactions, il serait intéressant de mesurer l'activité NO synthase de l'enzyme après incubation avec un réducteur fort (dithionite) qui semble rétablir le spectre d'absorption de l'enzyme et donc, potentiellement, l'état d'oxydation natif des groupes thiol de la protéine. Si ces modifications étaient parfaitement réversibles, nous pourrions alors proposer un véritable mécanisme de régulation de la toxicité des NOSs *via* l'oxydation sélective de résidus contrôlant la réactivité de la protéine.

De plus, des expériences menées par HPLC et spectroscopie RPE suggèrent que des résidus acides aminés puissent s'associer de manière covalente à la porphyrine, avec pour conséquence immédiate un changement de géométrie de l'hème, ce qui, une fois encore pourrait justifier la perte d'activité de l'enzyme.

Ensuite, nous avons mis en évidence une réaction de nitration auto-catalytique de iNOSoxy, et avons détecté par diverses méthodes la présence de résidus nitrotyrosine, dont les tyrosines Y14, Y78, Y383 et Y445, qui se situent à la surface de la protéine. Il est cependant intéressant d'observer que le résidu Y383 semble relié à l'hème par une succession de tyrosines (Y383 - Y261 - Y341 - Y367) qui pourraient ensemble permettre de transférer la nitration vers la surface de la protéine.

Par ailleurs, tout résidu aromatique est potentiellement cible de cette réaction. Ainsi nous avons suggéré la présence de résidus nitrotryptophane ou nitrophénylalanine, dont certains pourraient directement contribuer à l'inhibition de iNOSoxy. En effet la modification de

résidus à la surface de la protéine est moins susceptible d'affecter l'activité enzymatique, que celle de résidus qui se situent dans le canal d'accès du substrat (Trp84, Tyr485) ou à proximité du site actif (Phe363, Trp366, Tyr367).

Enfin, et peut être contrairement à la réaction d'oxydation, nous proposons que la nitration auto-catalytique de iNOSoxy intervienne surtout dans des conditions où il n'y aurait pas d'autres cibles que l'enzyme à nitrer. Ainsi, dans l'hypothèse d'une régulation de la toxicité des NOSs par inhibition auto-catalytique, nous suggérons qu'elle puisse avoir lieu en cas d'emballement de la réaction d'activation du PN en absence d'agents pathogènes à éliminer.

Pour résoudre l'ensemble des modifications ponctuelles, il faudrait pouvoir réaliser une étude exhaustive de iNOSoxy modifiée par PN, par spectrométrie de masse (MALDI-TOF), en prenant un soin particulier à l'élaboration d'un ensemble de banques de données qui prendrait en compte toutes les modifications potentielles citées jusqu'ici : création de ponts disulfure, oxydation de méthionine, dimérisation des tyrosines, nitration des résidus aromatiques, liaison covalente avec l'hème, et peut être d'autres encore.

Enfin, il serait intéressant de réaliser cette étude sur iNOSoxy ayant activé PN en présence du co-facteur H₄B au site actif. En effet, si iNOSoxy passe naturellement par la réaction dite cytotoxique, certaines isoformes de NOS ne forment le complexe Fe^{II}-NO qu'en absence de H₄B (eNOS), ce qui suggère que d'une certaine manière, le co-facteur puisse contrôler la production de PN au site actif des NOSs. Ainsi, la question se pose de savoir si en sa présence, les phénomènes d'oxydation et de nitration auto-catalytiques décrits ont toujours lieu ou si H₄B pourrait avoir pour effet de protéger iNOSoxy de son inhibition. En effet, dans la mesure où H₄B est une cible pour ces réactions (voir 1.3.2.) et qu'il y a assez de H₄B dans le milieu pour substituer au site actif le H₄B qui aurait été modifié, alors sa présence pourrait induire la levée des processus de régulation de l'activation du PN par iNOSoxy.

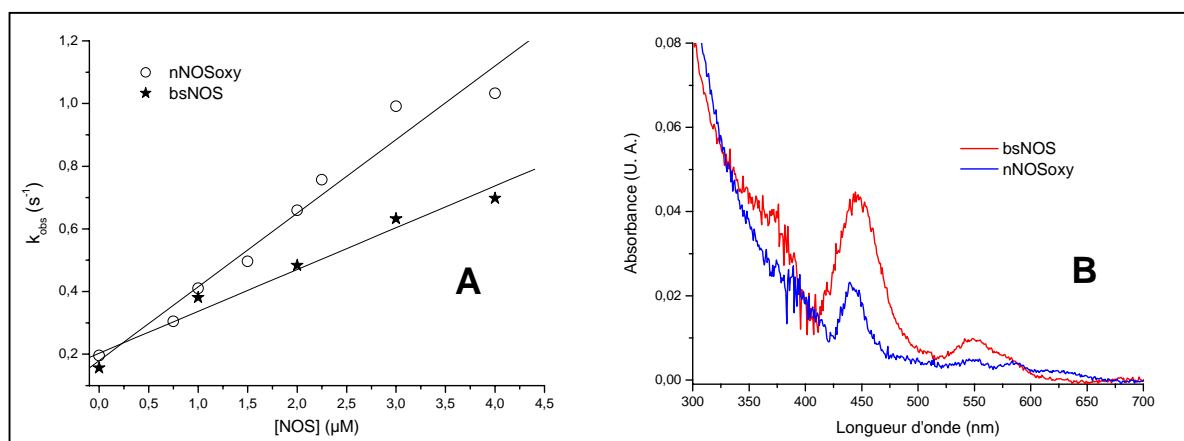


Figure III.52. Activation de 100 μ M PN par les isoformes neuronale et bactérienne de NOS dans KPi 0,1 M pH 7,4, en absence de CO₂. **A.** Evolution de la constante de vitesse de décomposition du PN en fonction de la concentration de NOS. **B.** Spectres d'absorption calculés pour l'intermédiaire (I) observé par expérience de mélange rapide lors de la réaction de PN avec les isoformes neuronale (spectre bleu) et bactérienne (spectre rouge) de NOS. Ils ont été obtenus par soustraction de 70 et 55 % du spectre initial aux spectres enregistrés à 240 et 600 ms respectivement.

4. Comparaison avec les isoformes neuronale et bactérienne de NO-synthase :

Sur la base des résultats obtenus pour iNOSoxy, nous avons voulu mener une étude comparative de la réaction du PN avec différentes isoformes de NOS. Ainsi le laboratoire de D. J. Stuehr a gracieusement mis à notre disposition des échantillons de NOS neuronale de mammifère (nNOSoxy) et d'un analogue de NOS de mammifère provenant de la bactérie *Bacillus subtilis* (bsNOS).

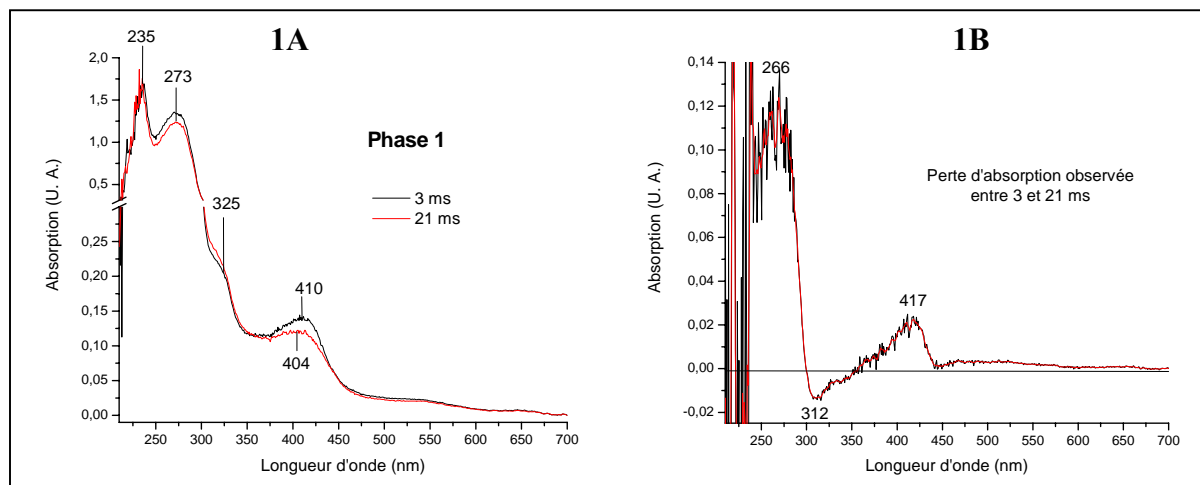
Dans un premier temps nous mettrons en évidence que, tout comme iNOSoxy, ces isoformes activent la décomposition du PN. Ensuite, nous présenterons une étude détaillée des transitions du spectre d'absorption des NOSs lors de leur réaction avec PN, suggérant un mécanisme réactionnel similaire à celui de iNOSoxy. Dans un second temps, nous mettrons en évidence la différence de réactivité observée pour le système {NOS + PN} suivant l'isoforme étudiée, et proposerons un modèle réactionnel plus complet pour la réaction d'activation du PN par les NOSs. Enfin, nous discuterons du rôle physiologique de chaque isoforme et montrerons que la spécificité des NOSs pourrait être liée à la réaction {NOS + PN}.

4.1. Cinétiques d'activation du peroxyinitrite par nNOSoxy et bsNOS :

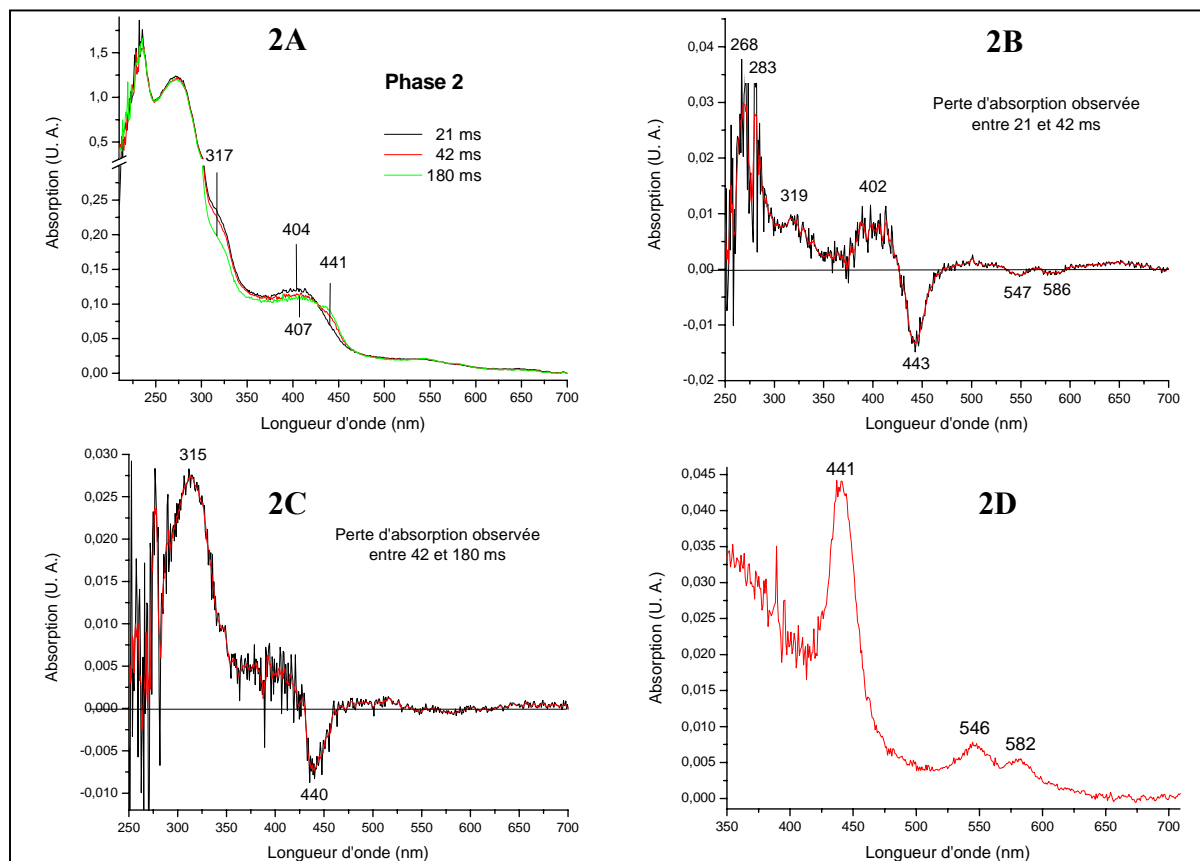
Des expériences de mélange rapide entre PN (100 μM) et les isoformes neuronale et bactérienne de NOS ont été réalisées à pH 7,4, en absence de CO_2 . Dans chaque cas, une accélération des cinétiques de décomposition du PN (k_{obs}) a été observée avec la concentration en isoforme, ce qui indique que nNOSoxy et bsNOS activent toutes deux sa décomposition. La figure III.52-A présente la modélisation linéaire des constantes de vitesse de décomposition du PN en fonction de la concentration d'enzyme. La constante d'activation du PN par nNOSoxy a été déterminée à $k_{\text{act}} = 22 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui est très proche de la valeur précédemment calculée pour iNOSoxy ($k_{\text{act}} = 21 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, voir 1.2.1.1.). La constante d'activation du PN par bsNOS est plus faible mais reste du même ordre de grandeur ($k_{\text{act}} = 13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Comme pour iNOSoxy, des transitions du spectre d'absorption des isoformes neuronale et bactérienne ont été observées lors de la décomposition du PN, ce qui confirme l'implication du fer de l'hème dans la réaction. De plus, la figure III.52-B présente les spectres d'absorption de l'intermédiaire (I), précédemment décrit pour iNOSoxy (voir 1.2.1.2.), qui ont pu être

Figure III.53. Analyse détaillée des phases observées lors de l'activation d'un excès de PN (100 μ M) par nNOSoxy (4 μ M) dans KPi 0,1 M à pH 6,4, en absence de CO₂.



1. Première phase de la réaction. A) Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 3 et 21 ms de réaction. B) Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 21 ms à celui enregistré à 3 ms; la différence positive d'absorption correspond à l'absorption perdue entre 3 et 21 ms de réaction.



2. Deuxième phase de la réaction. A) Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 21, 42 et 180 ms de réaction. B) Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 42 ms à celui enregistré à 21 ms. C) Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 180 ms à celui enregistré à 42 ms. D) Spectre d'absorption calculé pour l'intermédiaire (I) à $t = 180$ ms, par soustraction de 65 % du spectre enregistré à 6 ms.

calculés pour chaque isoforme. Celui obtenu pour nNOSoxy (fig. III.52-B, spectre bleu) est parfaitement superposable à celui de iNOSoxy ($\lambda_{\text{Soret}} = 444 \text{ nm}$). Par contre, le spectre d'absorption de l'intermédiaire (I) de bsNOS (fig. III.52-B, spectre rouge) est beaucoup plus intense que pour les autres isoformes dans les mêmes conditions expérimentales, et sa bande de Soret, centrée à 447 nm, semble beaucoup plus large.

Sans faire d'étude exhaustive des cinétiques d'activation du PN par ces isoformes, une même tendance d'accélération des constantes de vitesse a été observée avec l'acidité du milieu. Ceci suggère, comme dans le cas de l'activation par iNOSoxy, que l'acide peroxyinitreux réagit préférentiellement avec le fer de l'hème de nNOSoxy et bsNOS. Par exemple à pH 6,4, nous avons mesuré $k_{\text{obs}} = 2,30 \text{ s}^{-1}$ pour l'activation du PN par $4 \mu\text{M}$ nNOSoxy, contre $1,03 \text{ s}^{-1}$ à pH 7,4. De même l'amplitude du signal de l'intermédiaire (I) est toujours plus importante lorsque la réaction est réalisée à pH acide.

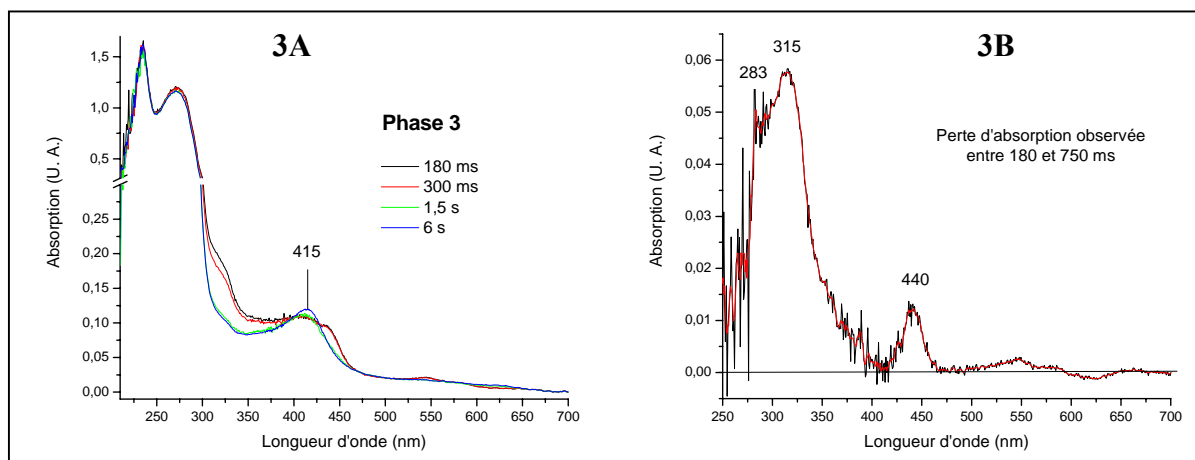
Tout comme l'isoforme inductible, les isoformes neuronale et bactérienne de NOS activent la décomposition du PN suivant des constantes de vitesse de second ordre déterminées autour de $10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. De plus, pour toutes, la réaction passe par la formation du même intermédiaire (I), précédemment décrit pour iNOSoxy. Cependant, il semble que l'isoforme bactérienne se démarque des isoformes de mammifères (iNOSoxy et nNOSoxy) avec une vitesse d'activation du PN un peu plus lente, et des caractéristiques de l'intermédiaire (I) légèrement différentes (intensité du spectre d'absorption plus forte et déplacement vers le rouge du maximum d'absorption de la bande de Soret, également plus large). Ainsi, nous proposons d'approfondir notre étude par une analyse détaillée de l'évolution des spectres d'absorption enregistrés lors de l'activation d'un excès de PN par nNOSoxy et bsNOS.

4.2. Analyse des phases observées lors de l'activation d'un excès de PN par les isoformes neuronale et bactérienne de NOS :

4.2.1. Pour l'isoforme neuronale :

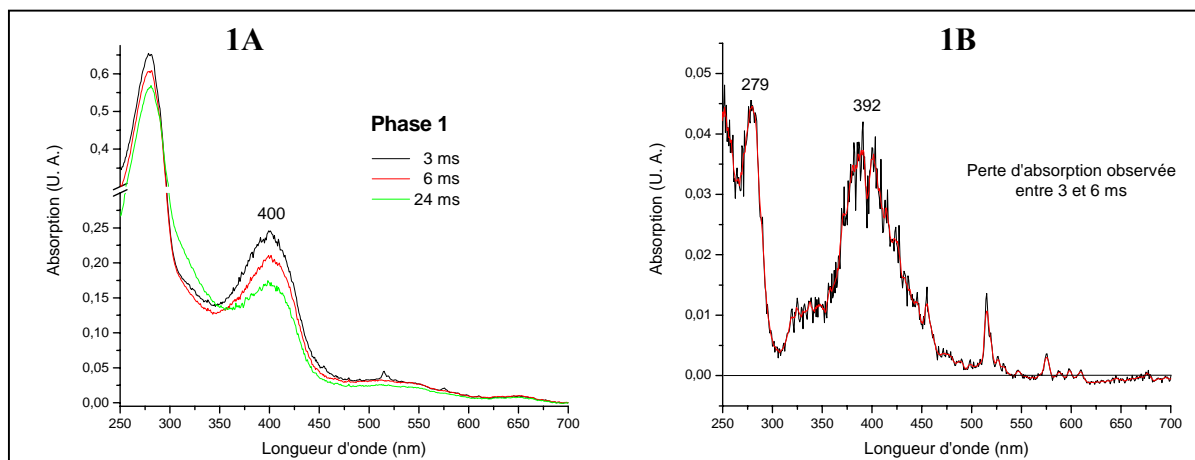
Nous avons réalisé cette analyse dans les meilleures conditions d'observation de l'intermédiaire (I) soit, pour l'isoforme neuronale, à pH 6,4. Les résultats présentés figure III.53 sont comparés à ceux précédemment obtenus pour iNOSoxy à la même valeur de pH (voir 2.2.1.).

Figure III.53. Analyse détaillée des phases observées lors de l'activation d'un excès de PN (100 μ M) par nNOSoxy (4 μ M) dans KPi 0,1 M à pH 6,4, en absence de CO₂.



3. Troisième phase de la réaction. A) Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 0,18, 0,3, 1,5 et 6 s de réaction. B) Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 750 ms à celui enregistré à 180 ms.

Figure III.54. Analyse détaillée des phases observées lors de l'activation d'un excès de PN (100 μ M) par bsNOS (4 μ M) dans KPi 0,1 M à pH 7,4, en absence de CO₂.



1. Première phase de la réaction. A) Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 3, 6 et 24 ms de réaction. B) Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 6 ms à celui enregistré à 3 ms; la différence positive d'absorption correspond à l'absorption perdue entre 3 et 6 ms de réaction.

Première phase : figure III.53-1. Le premier spectre d'absorption enregistré à 3 ms pour nNOSoxy présente une bande d'absorption large centrée à 410 nm (fig. III.53-1A). A cette valeur de pH, la bande de Soret devrait se situer à 419 nm. Il ne s'agit donc pas du spectre d'absorption de nNOSoxy native. De plus, la largeur de la bande d'absorption principale suggère la présence de plusieurs espèces. Dans les 21 premières ms cette bande se déplace de 410 à 404 nm, ce qui indique que le mélange d'espèces semble évoluer. Parallèlement l'absorption à 273 nm diminue tandis que celle à 317 nm augmente.

Deuxième phase : figure III.53-2. Entre 21 et 180 ms, la formation de l'intermédiaire (I) prédomine et l'absorption caractéristique de sa bande de Soret apparaît sur les spectres à 441 nm (fig. III.53-2A). Parallèlement la diminution de l'absorption à 317 nm est amorcée.

Troisième phase : figure III.53-3. Elle correspond à l'épuisement de l'absorption de l'intermédiaire (I), jusqu'à sa totale disparition, avec disparition totale de l'absorption à 317 nm. Le dernier spectre d'absorption, enregistré après 6 s de réaction, présente une bande de Soret centrée à 415 nm avec apparition de la bande d'absorption à 624 nm. Nous n'observons donc là non plus un retour vers l'état de coordination natif de l'hème, mais la formation d'une espèce nNOSoxy modifiée.

La réaction de PN avec nNOSoxy présente les mêmes caractéristiques que celle avec iNOSoxy. De plus, la modélisation mono-exponentielle de la trace cinétique enregistrée à 441 nm nous a permis de déterminer la constante de vitesse de formation de l'intermédiaire (I) à $30,4 \text{ s}^{-1}$, ce qui correspond parfaitement à celle précédemment déterminée pour l'intermédiaire (I) de iNOSoxy à cette valeur de pH. Ensemble, ces résultats suggèrent que le chemin réactionnel emprunté par les deux isoformes de mammifères puisse être le même.

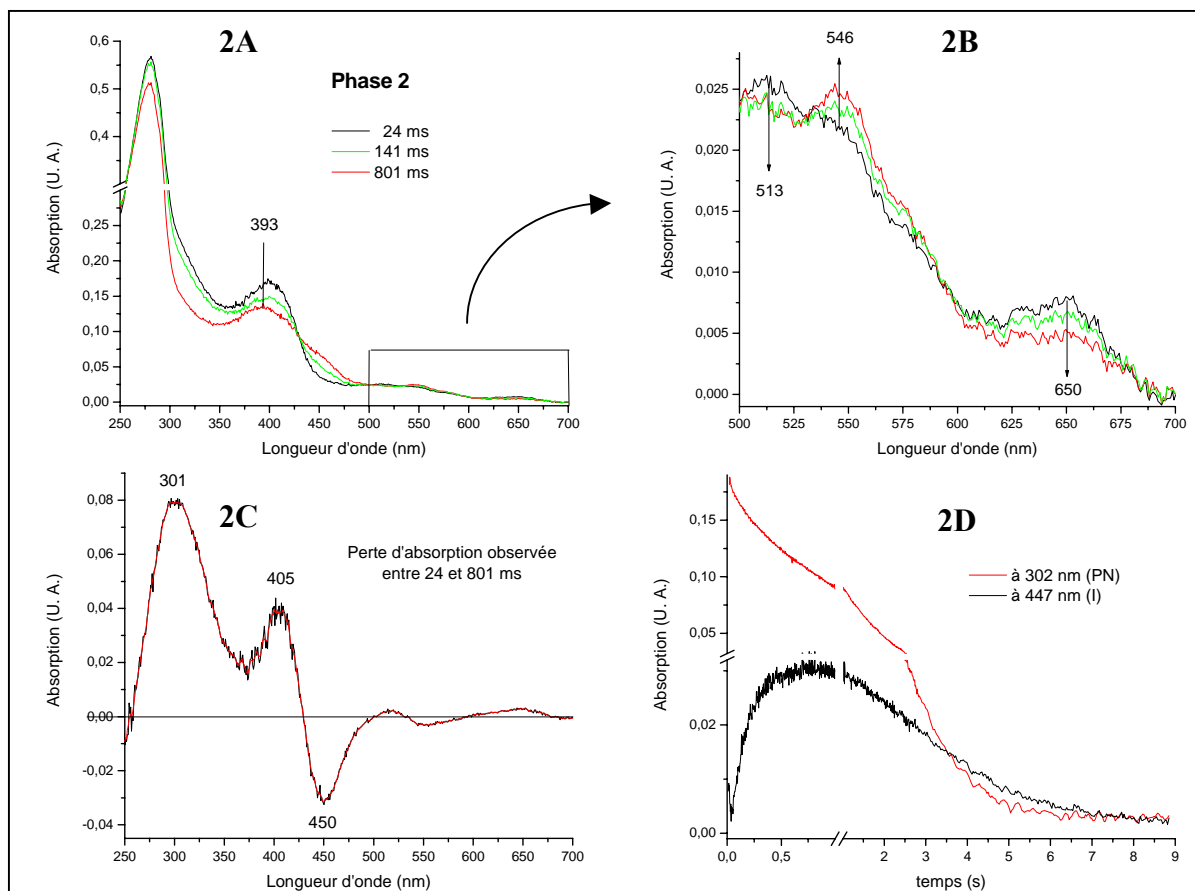
4.2.2. Pour l'isoforme bactérienne :

L'analyse des transitions spectrales lors de la réaction entre $4 \mu\text{M}$ bsNOS et $100 \mu\text{M}$ PN a été réalisée à pH 7,4. Les résultats sont présentés figure III.54.

Première phase : figure III.54-1. Le premier spectre d'absorption enregistré à 3 ms pour bsNOS présente une bande d'absorption large centrée à 400 nm (fig. III.54-1A), ce qui est proche du maximum d'absorption de bsNOS native à pH 7,4 (398 nm, Fe^{III} HS), mais semble représenter un mélange d'espèces. Dans les 24 premières ms l'intensité de la bande de Soret diminue.

Deuxième phase : figure III.54-2. Entre 24 et 801 ms, la formation de l'intermédiaire (I) prédomine et un épaulement apparaît sur les spectres à 450 nm (fig. III.54-3A). Parallèlement

Figure III.54. Analyse détaillée des phases observées lors de l'activation d'un excès de PN (100 μ M) par bsNOS (4 μ M) dans KPi 0,1 M à pH 7,4, en absence de CO₂.



2. Deuxième phase de la réaction. A) Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 24, 141 et 801 ms de réaction. B) Agrandissement de la zone d'absorption comprise entre 500 et 700 nm de la superposition de spectres de la 2^{ème} phase. C) Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 801 ms à celui enregistré à 24 ms. D) Superposition des traces cinétiques enregistrées à 302 nm (PN) et à 447 nm (I).

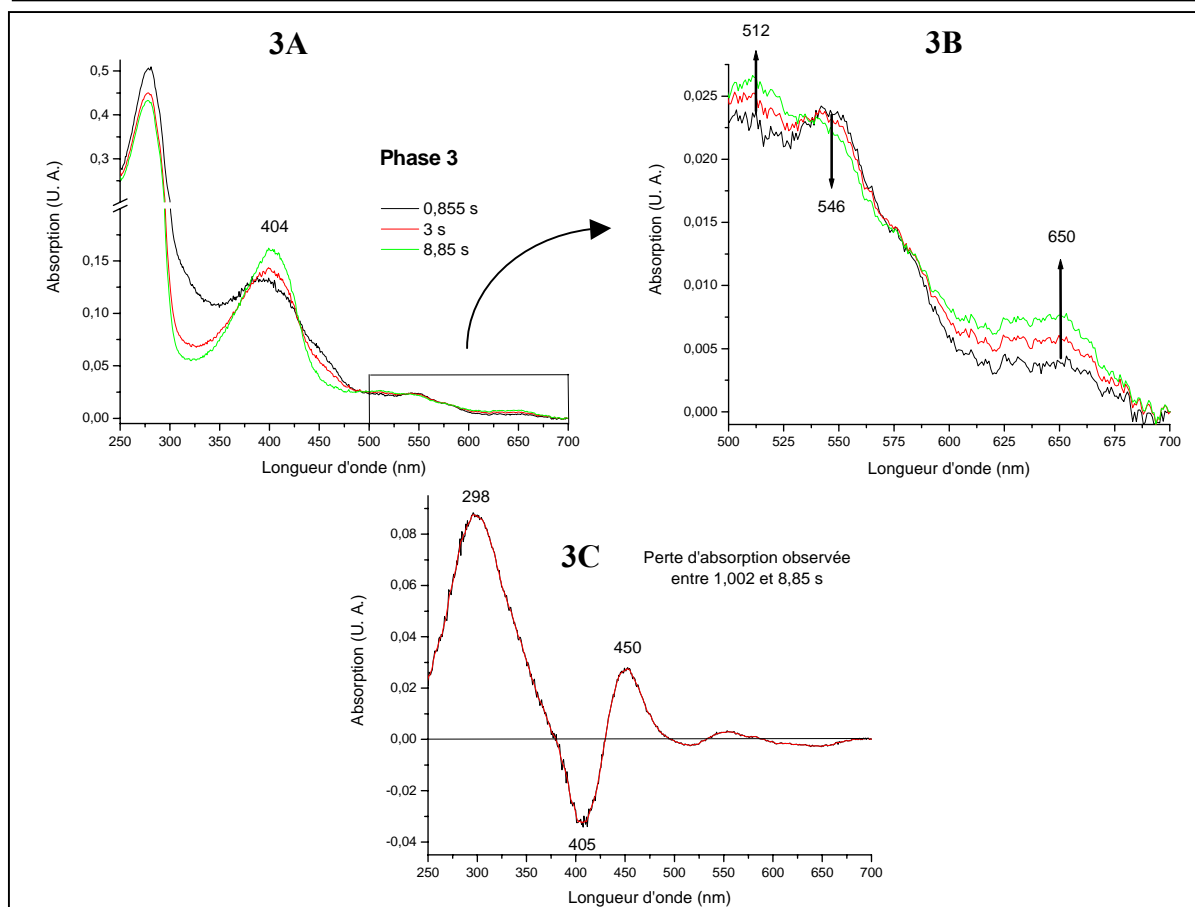
nous observons une diminution de l'absorption à 650 nm (fig. III.54-3B) et un déplacement de la bande de Soret, correspondant au mélange d'espèces Fe^{III} , vers 393 nm.

Troisième phase : figure III.54-3. Elle correspond à l'épuisement de l'absorption de l'intermédiaire (I) jusqu'à sa totale disparition (fig. III.54-3A), avec retour de l'absorption à 650 nm (fig. III.54-3B). Le spectre d'absorption de l'espèce finale a un maximum d'absorption centré à 404 nm, ce qui ne correspond pas à bsNOS native, bien que l'état de spin du fer semble être conservé (HS). Par ailleurs, la superposition des spectres initial et final ne semble pas indiquer de nouvelle absorption à 624 nm, ce qui suggère que bsNOS ne soit pas modifiée par l'activation du PN de la même manière que les deux isoformes de mammifères étudiées.

Ainsi l'analyse des transitions du spectre d'absorption de bsNOS au cours de sa réaction avec PN semble globalement correspondre à celles précédemment effectuées pour iNOSoxy et nNOSoxy. Par contre, la trace cinétique enregistrée à 447 nm, et correspondant à l'intermédiaire (I), présente des paramètres cinétiques très différents de ceux observés pour les isoformes de mammifères. D'une part, l'intermédiaire (I) de bsNOS a une durée de vie beaucoup plus longue que ceux de iNOSoxy et nNOSoxy, une phase stationnaire de 500 ms étant observée pour le maximum d'absorption. D'autre part, la constante de vitesse de formation de (I) est mesurée, par modélisation mono-exponentielle, à $6,03 \text{ s}^{-1}$, ce qui est 2,5 fois plus lent que pour les autres isoformes à cette valeur de pH (15 s^{-1}).

Nos résultats indiquent jusqu'ici que les trois isoformes de NOS, inductible, neuronale et bactérienne, pourraient globalement suivre le même mécanisme pour l'activation de PN. Par ailleurs, si les paramètres de réaction de iNOSoxy et nNOSoxy semblent être similaires, la formation de l'intermédiaire (I) de bsNOS est sensiblement plus lente, ce qui pourrait avoir des conséquences, notamment sur la réactivité liée à l'activation du PN. Cette hypothèse est soutenue par la non-apparition de la bande d'absorption à 624 nm sur le spectre d'absorption final de bsNOS, caractéristique de l'oxydation auto-catalytique de l'enzyme (voir 3.1.). Par conséquent, nous proposons à présent une étude de la réactivité du système {NOS + PN} pour les isoformes neuronale et bactérienne de NOS.

Figure III.54. Analyse détaillée des phases observées lors de l'activation d'un excès de PN (100 μ M) par bsNOS (4 μ M) dans KPi 0,1 M à pH 7,4, en absence de CO₂.



3. Troisième phase de la réaction. A) Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 0,855, 3 et 8,85 s de réaction. B) Agrandissement de la zone d'absorption comprise entre 500 et 700 nm de la superposition de spectres de la 3^{ème} phase. C) Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 8,85 s à celui enregistré à 1,002 ms.

	Oxydation à deux électrons	Oxydation à un électron	Nitration
iNOSoxy	- 56 %	+ 40 %	+ 90 %
nNOSoxy	- 72 %	- 22 %	+ 20 %
bsNOS	- 86 %	-83 %	- 70 %

Table III.11. Modification de la réactivité du PN en présence des isoformes inductible, neuronale et bactérienne de NOS dans KPi 0,1 M pH 7,4, en absence de CO₂. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité mesurée pour le PN seul, dans les mêmes conditions expérimentales, en absence de NOS et de CO₂.

4.3. Réactivité du peroxyinitrite activé par nNOSoxy et bsNOS :

4.3.1. Réactions d'oxydation à deux et un électrons, réaction de nitration :

A l'instar de iNOSoxy, nous avons étudié la capacité des systèmes {nNOSoxy + PN} et {bsNOS + PN} à réaliser l'oxydation à deux électrons, à un électron, et la nitration de composés extérieurs ou exogènes. Les protocoles appliqués sont les mêmes que pour iNOSoxy (voir 1.3. et chapitre II, 3.1.). Les résultats sont présentés figure III.55.

La réaction d'activation du PN par nNOSoxy et bsNOS a été réalisée en présence de DHR, marqueur pour la réaction d'oxydation à deux électrons, à pH 7,4 et en absence de CO₂. Une diminution de la production de rhodamine par PN est observée en présence de nNOSoxy et bsNOS, de - 72 % et - 86 % respectivement (fig. III.55, vert). Par ailleurs, aucune production de rhodamine n'a été observée par réaction des produits de décomposition du PN en présence de ces isoformes.

Nous avons ensuite testé la capacité de ces isoformes à modifier le pouvoir d'oxydation à un électron du PN, en suivant la dimérisation du marqueur HPA. En présence de nNOSoxy une faible diminution du taux de di-HPA formé est observée (- 22 %) (fig. III.55, jaune). BsNOS inhibe de manière plus significative cette réactivité du PN (- 83 %). La réaction des produits de décomposition du PN avec ces isoformes n'a par ailleurs permis aucune formation de di-HPA.

Après filtration des solutions pour retirer la protéine, ces mêmes échantillons ont été analysés par HPLC afin de détecter l'éventuelle présence de nitro-HPA. Le pic caractéristique de nitro-HPA a été observé pour tous les échantillons de PN activé par les NOSs. L'isoforme neuronale induit une augmentation de + 20 % de formation de nitro-HPA (fig. III.55, orange). L'isoforme bactérienne, elle, diminue drastiquement sa formation (- 70 %).

La table III.11 reprend l'ensemble des résultats obtenus au cours des études de modification de réactivité du PN en présence des différentes isoformes de NOSs. Toutes les isoformes, en plus d'activer la décomposition du PN, en modifient la réactivité. Cependant la réactivité observée est très différente suivant l'isoforme considérée. Toutes inhibent le potentiel d'oxydation à deux électrons du PN. L'isoforme inductible est la seule à favoriser les processus d'oxydation à un électron et de nitration du PN. En effet, l'isoforme neuronale ne semble pas modifier significativement ces processus. Quant à l'isoforme bactérienne, elle semble éteindre toute activité oxydante du PN. Nous proposons que cette spécificité de réactivité, observée pour chaque isoforme, puisse contribuer aux différents rôles biologiques des NO-synthases.

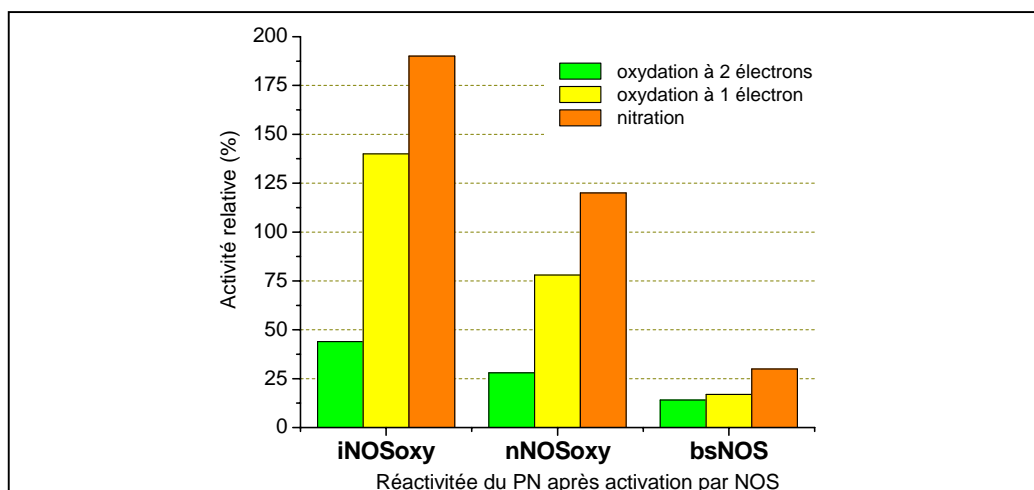


Figure III.55. Réactivité du système {NOS + PN} pour les isoformes inducible (iNOSoxy), neuronale (nNOSoxy) et bactérienne (bsNOS) de NOS à pH 7,4 et en absence de CO₂. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la réactivité du PN seul dans les mêmes conditions expérimentales. La réaction d'oxydation à deux électrons a été suivie par mesure de la quantité de rhodamine formée à partir de DHR par spectroscopie de fluorescence (vert). La réaction d'oxydation à un électron a été suivie par mesure de la quantité de di-HPA formé à partir de HPA également par spectroscopie de fluorescence (jaune). La réaction de nitration a été suivie par détection du nitro-HPA formé à partir de HPA par HPLC (orange).

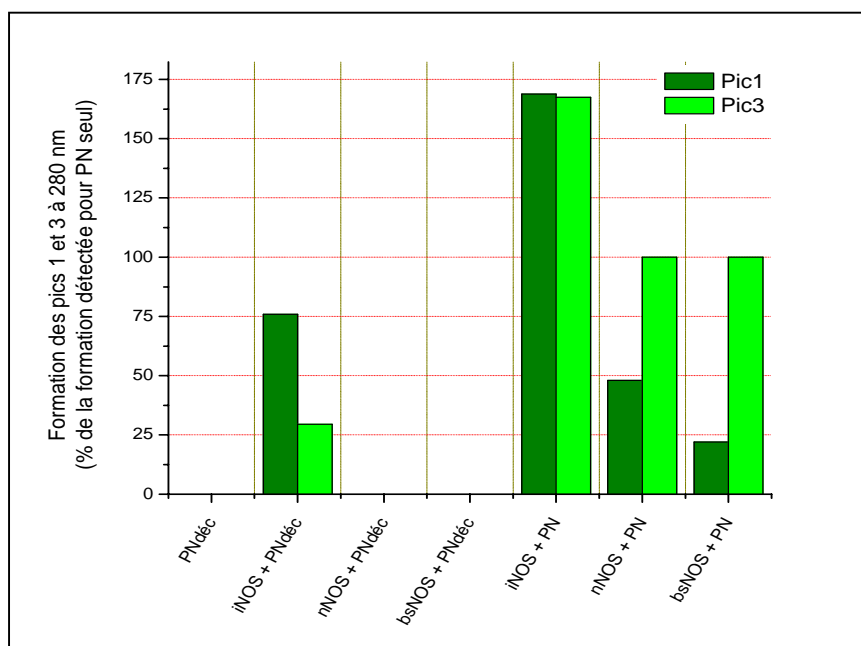


Figure III.56. Comparaison de l'évolution de l'aire des pics 1 et 3, détectés à 280 nm par HPLC, en fonction de la concentration de PN, lors de l'analyse des échantillons de HPA ayant réagit avec PN décomposé seul, puis en présence de iNOSoxy, nNOSoxy et bsNOS, et des échantillons de HPA ayant réagit avec PN en présence de iNOSoxy, nNOSoxy et bsNOS. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'évolution de l'aire de pic mesurée pour le PN seul, dans les mêmes conditions expérimentales, en absence de NOS et de CO₂.

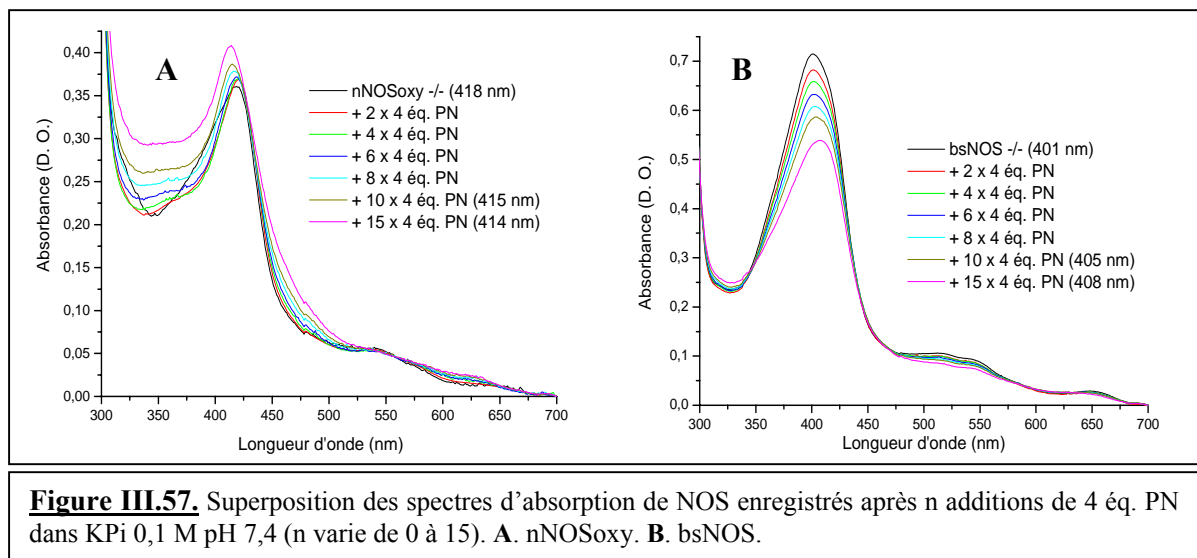
D'un point de vue mécanistique, et comme nous l'avons précédemment discuté lors de l'étude de l'isoforme inductible de NOS, l'inhibition de la réactivité d'oxydation à deux électrons, observée pour chaque isoforme, suggère que la réaction d'activation du PN ne passe pas par un intermédiaire type composé I (voir 1.3.). Ainsi, puisque le même intermédiaire (I) a été observé pour toutes les isoformes, nous proposons que le mécanisme réactionnel emprunté puisse être le même pour toutes, jusqu'à la formation de l'oxoferryl. Ce serait alors le devenir du couple $\{\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}\cdots\text{NO}_2\}$ qui contrôlerait la réactivité induite par chaque isoforme. Ainsi, dans le cas de l'isoforme inductible, l'oxoferryl pourrait oxyder divers composés, ensuite libres de recombinaison avec les radicaux $\cdot\text{NO}_2$ pour former des produits nitrés. Dans le cas de l'isoforme bactérienne, qui semble détoxifier 100 % du PN, nous proposons un mécanisme de recombinaison entre l'oxoferryl et les radicaux $\cdot\text{NO}_2$, qui pourrait conduire à l'isomérisation finale du PN en nitrates. Ce mécanisme serait par ailleurs soutenu par l'hypothèse suivant laquelle bsNOS ne libérerait pas NO, après sa biosynthèse, du fait de la contrainte stérique imposée par la présence d'un résidu isoleucine à la place d'une valine pour les autres isoformes de NOS [69]. De la même façon, bsNOS piègerait les radicaux $\cdot\text{NO}_2$ ainsi stériquement contraints à réagir avec l'oxoferryl.

4.3.2. Autres réactions :

Les chromatogrammes enregistrés à 280 nm en HPLC, lors de l'analyse des produits de réactions de HPA par PN en présence de nNOSoxy et bsNOS, n'ont pas permis la détection de l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (HO-HPA). Il semble donc que l'activation du PN par ces isoformes, comme par iNOSoxy, n'induit pas la formation de cette espèce, ce qui est en accord avec l'absence de formation d'un composé I.

Par ailleurs les chromatogrammes correspondant aux échantillons HPA plus PN en présence des isoformes, présentaient le même massif de trois pics à 280 nm, entre les temps de rétention 11 et 12 min (voir chapitre II, 3.1.3.). L'évolution de l'aire de ces pics en fonction de la concentration de PN est présentée figure III.56. nNOSoxy et bsNOS diminuent de -52 % et -78 % respectivement la formation du pic 1, par comparaison au PN seul. La formation du pic 3 n'est pas affectée par la présence de nNOSoxy et bsNOS.

Enfin, contrairement à iNOSoxy, la réaction des produits de décomposition du PN avec nNOSoxy et bsNOS ne permet pas la formation de ces deux composés, restés non identifiés. La réactivité du système $\{\text{PN décomposé} + \text{iNOSoxy}\}$ ayant été attribuée à une activité peroxydase de cette isoforme, nos résultats suggèrent que les isoformes nNOSoxy et bsNOS puissent en être dépourvus. Cependant cette hypothèse reste à démontrer.



L'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence des différences de réactivité significatives pour le système {NOS + PN}, en fonction de l'isoforme considérée. En effet il semble que les isoformes neuronale et surtout bactérienne de NOSs, à la différence de l'isoforme inductible, n'aient pas cette capacité à amplifier la toxicité du PN, de manière à générer un stress oxydant et nitrant. Ainsi nous avons proposé que, si toutes activent la décomposition du PN suivant le même mécanisme de formation de l'intermédiaire (I), le devenir de la paire $\{\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}\cdots\text{NO}_2\}$ au site actif de chaque isoforme puisse contrôler la réactivité. Suivant cette hypothèse, il serait intéressant de savoir si les processus d'oxydation et de nitration auto-catalytiques observés pour iNOSoxy existent pour les autres isoformes, et si oui, si ils ont également une influence sur leur activité enzymatique. Ainsi, nous proposons à présent une étude préliminaire de ces phénomènes pour nNOSoxy et bsNOS.

4.4. Conséquences de l'activation d'un excès de peroxyinitrite par nNOSoxy et bsNOS :

4.4.1. Modifications observées en spectroscopie d'absorption UV-visible :

La figure III.57-A présente la superposition des spectres d'absorption de nNOSoxy enregistrés au fil d'additions successives de 4 éq. PN dans KPi 0,1 M pH 7,4. Un déplacement du maximum d'absorption de la bande de Soret vers le bleu et l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption à 624 nm sont observés. Ce comportement est similaire à celui de iNOSoxy (voir 3.1.1.) et suggère une oxydation auto-catalytique de l'enzyme. Cependant, en deçà de 400 nm, aucun point isobestique n'est mis en évidence au cours de la modification du spectre d'absorption de l'enzyme. De plus, la bande de Soret s'élargit et gagne en amplitude. Ces observations sont représentatives du phénomène de diffusion lié à la précipitation de l'enzyme en solution et suggèrent une dégradation de nNOSoxy.

La figure III.57-B présente la superposition des spectres d'absorption enregistrés pour bsNOS lors de la même expérience. Le maximum d'absorption de la bande de Soret se déplace vers le rouge, de 400 à 407 nm, et aucune modification dans l'absorption à 624 nm n'est observée. Ces observations vérifient celles précédemment effectuées au cours des expériences de mélange rapide entre bsNOS et PN (voir 4.2.2.).

Enfin, nous avons observé un verdissement des solutions de iNOSoxy et nNOSoxy au fil des activations successives de PN, ce qui suggère la formation de « composé vert ». L'existence de ce type de composé a été mise en évidence chez les cytochromes P450, et correspondrait à

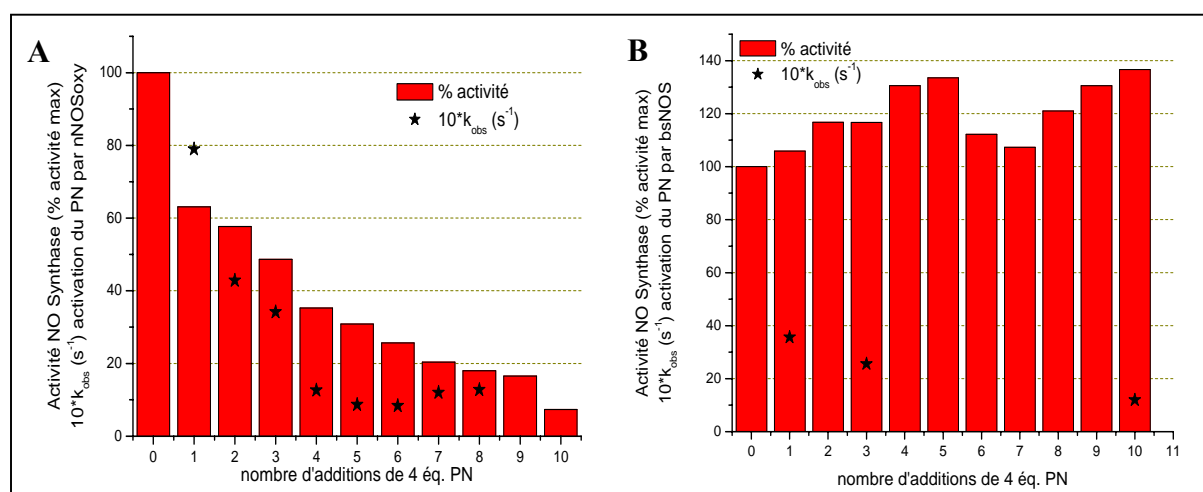


Figure III.58. Effet d'activations successives de PN par nNOSoxy (A) et bsNOS (B) sur leurs propriétés enzymatiques. Histogrammes: inhibition de l'activité NO synthase de nNOSoxy et bsNOS après activation de $n \times 4$ éq. PN. Etoiles: inhibition de la capacité de nNOSoxy et bsNOS à activer la décomposition du PN après activation de $n \times 4$ éq. PN.

un phénomène de dégradation de la protéine, par nitration de la porphyrine. Par ailleurs la solution de bsNOS, elle, garde sa couleur rouge orangé.

Les spectres d'absorption UV-visible des isoformes sont donc tous affectés par plusieurs activations de PN. Néanmoins l'isoforme bactérienne semble se distinguer des isoformes de mammifères, d'une part par la non-apparition de l'absorption à 624 nm, et d'autre part par l'observation d'un déplacement vers le rouge de l'absorption de sa bande de Soret. Ainsi, si dans le cas de iNOSoxy et nNOSoxy le déplacement de la bande de Soret vers le bleu aurait pu refléter une transition partielle du spin vers un état HS, dans le cas de bsNOS, le déplacement vers le rouge suggère plutôt une transition partielle vers un état LS.

4.4.2. Activité des NOSs après activation du PN :

Le test de Griess a été réalisé sur une gamme d'échantillons de nNOSoxy et bsNOS après activation d'un nombre croissant d'additions de 4 éq. PN.

La figure III.58-A montre l'inhibition progressive de l'activité NO synthase de l'isoforme neuronale avec le nombre d'additions de PN activé, ce qui rappelle les résultats précédemment obtenus avec iNOSoxy (voir 3.4.1.).

La fonction physiologique de l'isoforme bactérienne à synthétiser NO n'est pas clairement démontrée et l'activité basale mesurée par le test de Griess pour cette isoforme est beaucoup plus faible que pour iNOSoxy ou nNOSoxy (≈ 30 fois moins de nitrites détectés par rapport à nos préparations de iNOSoxy). Par ailleurs, ce test peut également être réalisé en absence de co-facteur H_4B dans le milieu avec, dans ces conditions, une même quantité de nitrites formée. Quelles que soient les conditions expérimentales du test de Griess (avec ou sans H_4B), la mesure d'activité NO synthase de bsNOS est restée inchangée après activation de une à dix additions de 4 éq. PN (fig. III.58-B).

Nous avons ensuite calculé les constantes cinétiques de décomposition successive du PN par les deux isoformes (fig. III.58, étoiles), qui semblent diminuer au fil des ajouts de PN. Les cinétiques de décomposition du PN sont cependant toujours parfaitement modélisées par une fonction mono-exponentielle, ce qui suggère que l'inhibition des NOSs, dans leur capacité à activer le PN, a lieu sur une échelle de temps différente de la décomposition du PN.

Les isoformes inductible et neuronale semblent toutes deux suivre le même profil d'inhibition, tant pour la fonction NO synthase que pour leur capacité à activer la décomposition du PN. La capacité de l'isoforme bactérienne à synthétiser des nitrites ne semble par ailleurs pas altérée,

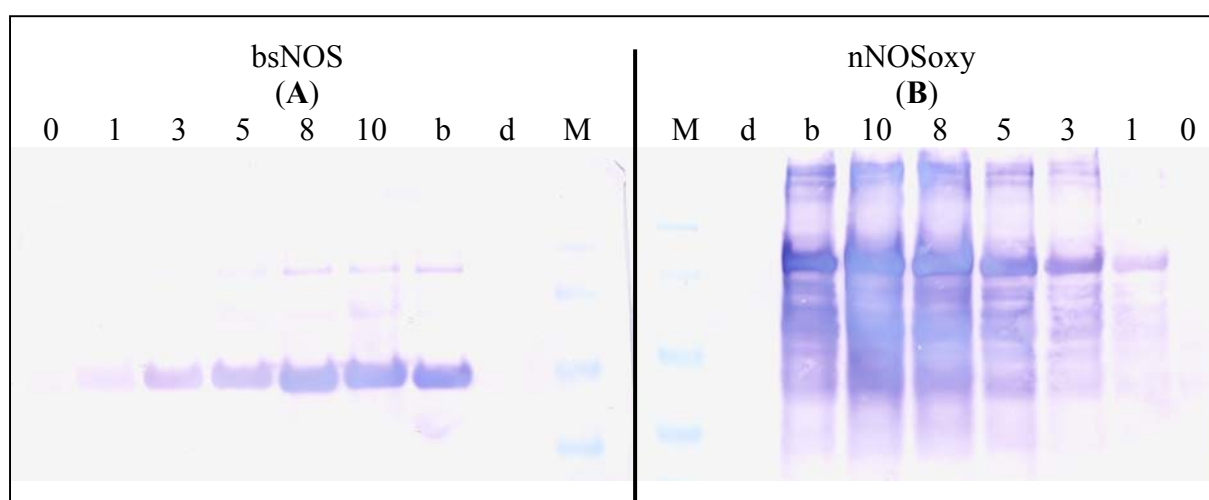


Figure III.59. Photo des membranes d'immuno-précipitation révélant la présence de résidus nitrotyrosine sur les échantillons de bsNOS (A) et nNOSoxy (B) modifiés par 0 - 1 - 3 - 5 - 8 - 10 additions de 4 équ. PN dans KPi 0,1 M plus DTPA 0,3 mM pH 7,4. L'échantillon (b) correspond à l'activation de 40 équ. PN par les NOS. L'échantillon (d) correspond à l'ajout de 40 équ. PN décomposé à la solution de NOS. Le puits noté (M) est celui dans lequel a migré le mélange protéique servant de marqueur de poids moléculaire.

même après activation de dix additions consécutives de PN. Puisque le spectre d'absorption de bsNOS est le seul à ne pas présenter d'augmentation de l'absorption à 624 nm, nous proposons que cette modification structurale puisse être celle qui inhibe l'activité NO synthase des NOSs. Cependant bsNOS semble perdre, comme les autres isoformes, son potentiel à activer la décomposition du PN. Ces résultats nous amènent à poser la question du rôle physiologique de bsNOS, et ainsi de la pertinence du test de Griess pour mesurer son activité.

4.4.3. Détection de nitrotyrosines :

Une expérience d'immuno-précipitation avec des anti-corps anti-nitrotyrosine a été réalisée sur les échantillons de nNOoxy et de bsNOS ayant servi au test de Griess. La figure III.59 montre que des résidus nitrotyrosine sont détectés sur tous les échantillons, proportionnellement au nombre d'additions de PN activé. La nitration de ces résidus semble bien liée à l'activation du PN par les NOSs puisque les échantillons de NOSs en présence de PN mis à décomposer au préalable dans la solution ne présentent aucun signal (fig. III.59, puits (d)).

Par ailleurs, la membrane d'immuno-précipitation obtenue à partir des échantillons de nNOSoxy (fig. III.59-B) indique la présence de divers fragments protéiques porteurs de résidus nitrotyrosine. Ceci suggère une protéolyse de nNOSoxy, qui pourrait être due à l'activation du PN.

D'autre part, la position des NOSs nitrées sur la membrane diffère entre les isoformes, comme en témoigne la migration du marqueur de poids moléculaire. Ainsi après activation du PN, bsNOS migre presque exclusivement sous forme de monomères alors que nNOSoxy migre majoritairement sous forme dimérique. Ceci suggère la formation de liaisons covalentes entre les monomères de nNOSoxy, peut être par création de ponts disulfures par oxydation de résidus cystéine. Le profil de migration de iNOSoxy nitrée présentait une co-existence des deux formes avec cependant une majorité de monomères ($\approx 60\%$, voir 3.2.1.).

Ces expériences préliminaires suggèrent qu'en conditions d'excès de PN, toutes les isoformes de NOSs soient inhibées *via* des processus de nitration et/ou d'oxydation auto-catalytiques, précédemment décrits pour iNOSoxy (voir 3.). Par ailleurs, les expériences d'immuno-précipitation indiquent que si bsNOS est incapable de nitrer des composés du milieu extérieur, elle est capable de nitration auto-catalytique, ce qui prouve que bsNOS, comme les autres

isoformes, active PN et forme la paire $\{\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}\cdots\text{NO}_2\}$ en son site actif. Cependant nos résultats suggèrent que les radicaux $\cdot\text{NO}_2$, comme NO, ne peuvent diffuser vers le milieu extérieur. Ainsi nous proposons deux scénarios pour le devenir du système $\{\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}\cdots\text{NO}_2\}$ de bsNOS, qui peuvent être relatifs tant au rapport de concentrations entre PN et l'enzyme qu'au véritable rôle physiologique de cette isoforme. Le premier scénario serait basé sur un processus de recombinaison de l'oxoferryl avec le radical $\cdot\text{NO}_2$ comme précédemment proposé (voir 4.3.1), et induisant la complète détoxication du PN. Le second scénario résiderait en une nitration auto-catalytique visant à inhiber immédiatement l'enzyme si elle permettait la biosynthèse de PN *via* la réaction d'oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$. Une étude de la réaction entre PN et bsNOS en condition stoechiométrique de concentrations pourrait permettre de discriminer entre ces deux hypothèses. Quoiqu'il en soit, il semble clair que bsNOS ne peut être, comme iNOSoxy, source d'un stress oxydant.

4.5. Discussion et perspectives :

Cette étude a démontré que, tout comme iNOSoxy, les isoformes neuronale et bactérienne de NO-synthase fixent et activent la décomposition du peroxytnitrite. Ainsi, dans l'hypothèse de biosynthèse de PN au site catalytique des NOSs, *via* la réaction d'oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$, aucune de ces isoformes ne libérerait le PN formé. Par ailleurs la réactivité du système $\{\text{NOS} + \text{PN}\}$ s'est avérée très différente d'une isoforme à l'autre, et nous proposons que cette observation puisse témoigner de leur spécificité physiologique. En effet, nos résultats indiquent que iNOSoxy est à même de générer un réel stress oxydant et nitrant, ce qui semble en accord avec son implication dans la réponse immunitaire non-spécifique. L'isoforme neuronale, elle, semble adopter un comportement plus modéré à savoir que si elle était capable de synthétiser PN, elle n'en augmenterait pas le potentiel toxique. Ainsi, l'activité « cytotoxique » de l'isoforme neuronale n'aurait pas la même ampleur que celle de l'isoforme inductible, ce qui pourrait aller dans le sens de son implication dans le développement de pathologies lentes et dégénératives type Alzheimer ou Parkinson. Quant à l'isoforme bactérienne, dont la fonction physiologique n'est toujours pas connue, elle semble totalement détoxifier PN. Ainsi, plutôt que de représenter une source de toxicité, bsNOS pourrait être impliquée dans un système de défense de la bactérie, en assurant la détoxication du PN synthétisé à proximité.

Par ailleurs, quelle que soit l'isoforme, nous proposons que la réaction d'activation du PN passe par le même mécanisme de formation d'une paire $\{\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}\cdots\text{NO}_2\}$. Pour rendre compte

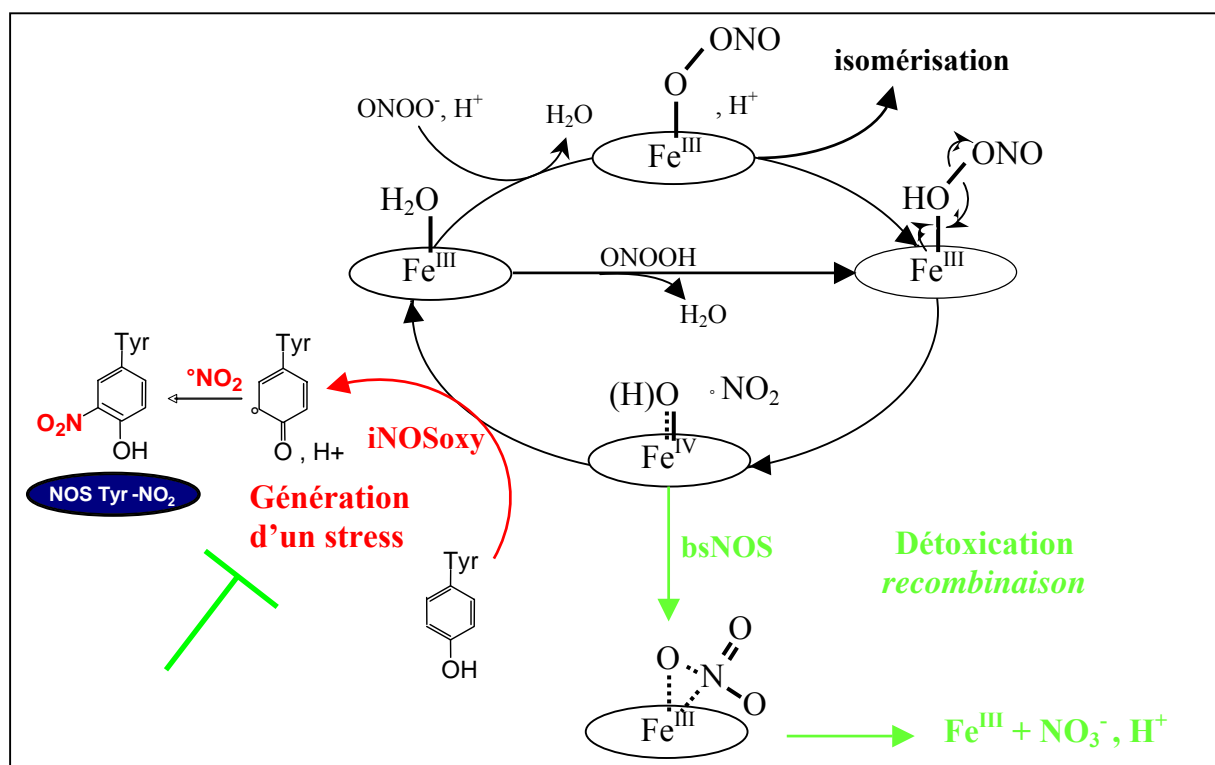


Figure III.60. Modèle réactionnel proposé pour la réaction des NOSs avec PN, rendant compte de la spécificité physiologique des isoformes inductible et bactérienne.

de la spécificité de chaque isoforme, nous suggérons que le devenir de ce système puisse être contrôlé par l'environnement de l'hème. Ainsi, dans le cas de iNOSoxy les radicaux $\cdot\text{NO}_2$ seraient libres de diffuser vers le milieu extérieur, alors que dans le cas de l'isoforme bactérienne ils seraient piégés au site catalytique de l'enzyme. En effet, une des particularités de bsNOS est la substitution d'un résidu valine par une isoleucine, plus encombrante, au dessus du fer de l'hème, et nous pensons qu'elle puisse suffire à empêcher la diffusion des radicaux vers le milieu extérieur (NO ou $\cdot\text{NO}_2$). Le radical $\cdot\text{NO}_2$ formé pourrait alors soit réagir avec l'oxoferryl et former des nitrates, soit recombinaison avec un résidu oxydé de la protéine suivant un mécanisme de nitration auto-catalytique.

Par ailleurs, en conditions d'excès de PN, il semble que toutes les isoformes soient soumises à des processus d'inhibition auto-catalytique, par oxydation ou nitration de résidus acides aminés, qui, dans le cas des isoformes de mammifères, pourraient constituer une voie de régulation de la toxicité induite par les NOSs.

L'ensemble des hypothèses développées au cours de l'étude de la réaction d'activation du PN par les NOSs est repris dans un schéma présenté figure III.60.

Enfin, il semble que l'intermédiaire (I) ait une durée de vie beaucoup plus longue dans le cas de la réaction du PN avec l'isoforme bactérienne qu'avec les autres, ce qui fait de bsNOS la candidate idéale pour une expérience de caractérisation spectroscopique de cette espèce. Nous avons entrepris de piéger cet intermédiaire pour le caractériser par spectroscopie Raman de résonance. Malheureusement, il semble que le temps associé à la préparation et à la congélation manuelles de l'échantillon n'ait pas permis le piégeage de l'intermédiaire. En effet, les spectres Raman enregistrés étaient tous représentatifs de l'isoforme bactérienne dans une solution de PN décomposé. Le laboratoire étant dorénavant équipé d'un dispositif de *freeze quench*, la réalisation de cette expérience apparaît comme prioritaire pour l'avancée de ce travail de recherche. En effet, seule une caractérisation de l'intermédiaire (I), et éventuellement des espèces formées en amont, pourrait permettre de conclure sur la validité de notre modèle réactionnel.

Chapitre IV.

Caractérisation du complexe Fe^{II}-NO

Articles associés :

1. Maréchal A., Balland V., Mattioli T. A., Stuehr D. J., Santolini J. (200.) *Evolution of Fe^{II}/Fe^{III} redox potential of the inducible NO-Synthase as a function of pH and heme environment.* Manuscrit en cours d'écriture.
2. Maréchal A., Boussac A., Mattioli T. A., Stuehr D. J., Santolini J. (200.) *EPR characterization of Fe^{II}-NO complexes formed by different NO-Synthase isoforms.* Manuscrit en cours d'écriture.

1. Etude du potentiel d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de iNOSoxy :

Dans le cadre de l'étude de la réaction cytotoxique des NOSs, le potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ est un des éléments majeurs à déterminer. Un seul article rapporte la mesure directe de ce potentiel pour l'isoforme neuronale de NOS par spectroélectrochimie [179] et, comme nous le discuterons plus tard (voir 1.2.), plusieurs éléments ouvrent ces travaux à la critique. Ainsi, nous avons mis en place, en collaboration avec le Dr Véronique Balland, une nouvelle méthodologie de spectroélectrochimie pour réaliser la mesure des potentiels redox de différents complexes de iNOSoxy.

Dans un premier temps nous avons étudié l'évolution du potentiel du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy en fonction du pH, et dans différentes conditions d'environnement de l'hème. A. K. Udit [180] et M. Bayachou [181] ont été les premiers à s'intéresser à l'évolution du potentiel redox des NOSs en fonction du pH, par voltamétrie cyclique sur la protéine immobilisée à la surface de l'électrode. Ces travaux leur ont permis de mettre en évidence la participation d'un proton de la molécule d'eau fixée sur le fer de l'enzyme native (en absence de substrat et de co-facteur), au cours de la réaction d'oxydoréduction de iNOS et nNOSoxy respectivement. En complément de leurs observations, notre étude montrera que l'évolution du potentiel de iNOSoxy en fonction du pH dépend intrinsèquement de l'environnement de l'hème.

Dans une deuxième partie, nous démontrerons la capacité de notre système électrochimique à réaliser l'étude du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de iNOSoxy + Arg/+H₄B.

Enfin nous mettrons en évidence que les propriétés d'oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ ne sont pas uniquement corrélées aux propriétés électroniques de l'hème.

1.1. Evolution du potentiel d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy en fonction de l'environnement de l'hème et du pH :

La détermination du potentiel d'un couple redox par spectroélectrochimie, en solution, implique de disposer d'un médiateur pouvant assurer le transfert des électrons de l'électrode au fer de l'hème. Pour cela le médiateur doit satisfaire différents critères : 1) il doit pouvoir diffuser facilement et rapidement entre l'électrode et le centre redox à étudier ; 2) il doit constituer un système parfaitement réversible avec une forme oxydée et une forme réduite stables dans les conditions de l'expérience ; 3) le potentiel redox du médiateur doit se situer dans la gamme de potentiel du couple redox à étudier (± 100 mV) ; 4) il ne doit pas y avoir

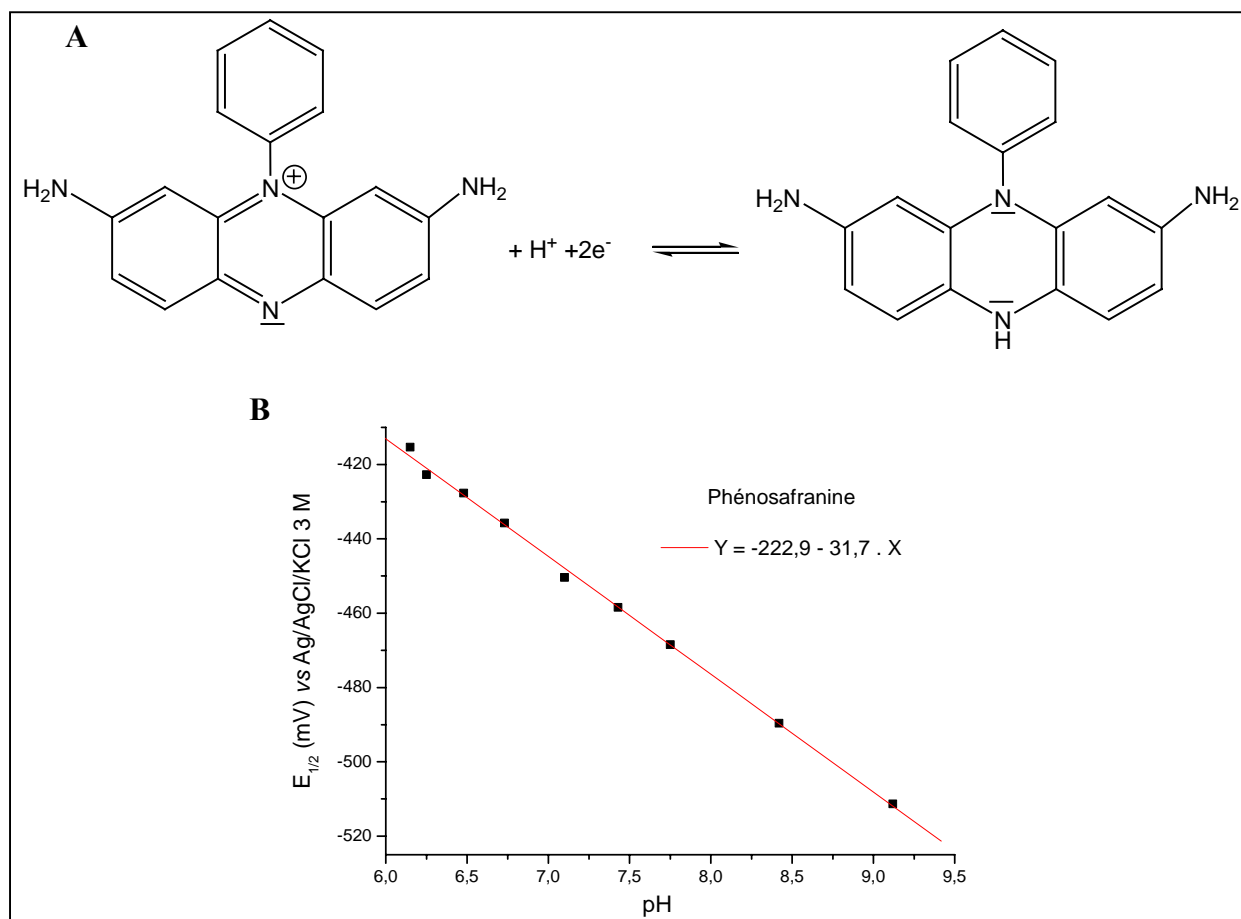


Figure IV.1. Présentation du médiateur choisi pour l'étude de l'évolution du potentiel d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy dans différentes conditions d'environnement de l'hème. **A.** Demi-équation redox de la phénosafranine. **B.** Evolution du potentiel d'oxydoréduction $E_{1/2}$ (mV, vs Ag/AgCl/KCl 3 M) de la phénosafranine, mesuré dans KPi 0,1 M plus 0,1 M KCl, en fonction de la valeur du pH.

d'interactions entre le médiateur et la protéine ; 5) l'absorption du médiateur ne doit pas masquer les variations d'absorption de la protéine au cours de sa réaction d'oxydoréduction. L'étude de l'évolution du potentiel d'oxydoréduction du couple Fe^{III}/Fe^{II} en fonction du pH, puis de l'environnement de l'hème, a été réalisée pour différents complexes de iNOSoxy par spectroélectrochimie. D'après les travaux de A. Presta, le potentiel redox des espèces HS est attendu autour de -260 mV *versus* ENH [75]. Dans un premier temps, nous avons reproduit le protocole utilisé par cette équipe (mêmes médiateurs, mêmes concentrations). Les variations d'absorption du mélange de médiateurs utilisé couvraient toute la zone du visible sans présenter un seul point isobestique pour suivre la réaction d'oxydoréduction de la protéine. De plus, l'instabilité du système ne nous a pas permis de déterminer un mode de correction fiable de la contribution des médiateurs, remettant en question les valeurs de potentiels rapportées par cette équipe. Ainsi nous avons choisi de mener cette étude en présence d'un seul médiateur : la phénosafranine.

1.1.1. Etude du médiateur : la phénosafranine.

Dans un premier temps, l'évolution du potentiel $E_{1/2}$ de la phénosafranine a été étudiée sur la gamme de pH pour laquelle sera ensuite réalisée l'expérience avec la protéine.

La phénosafranine en solution est de couleur rose et présente un maximum d'absorption à 521 nm ($\epsilon_{\text{ox}, 521 \text{ nm}} \approx 38\,210 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Le spectre d'absorption UV-visible de la phénosafranine évolue lors de sa réduction, la forme réduite présentant un maximum d'absorption à 356 nm ($\epsilon_{\text{red}, 356 \text{ nm}} \approx 12\,237 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Le titrage redox de ce médiateur fait apparaître deux points isobestiques, à 312 nm et 406 nm (voir chapitre II, 4.3.1., fig. II.17). Ce dernier sera exploité pour le suivi de la réduction des espèces Fe^{III} de iNOSoxy. De même, aucune forme du médiateur n'absorbant à 650 nm, la réduction de la protéine pourra également être suivie à cette longueur d'onde, caractéristique de l'absorption de la bande de transfert de charge des espèces Fe^{III} HS de NOS.

Lors de sa réduction, la phénosafranine échange un proton et deux électrons, comme en témoigne la demi-équation redox présentée figure IV.1-A. Ainsi l'équation de Nernst s'écrit :

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \times \ln \left(\frac{[H^{+}] \times [ox]}{[red]} \right) = E^{\circ} + \frac{RT}{2F} \times \ln([H^{+}]) + \frac{RT}{2F} \times \ln \left(\frac{[ox]}{[red]} \right) = E_{1/2} + \frac{RT}{2F} \times \ln \left(\frac{[ox]}{[red]} \right)$$

$$\text{avec } E_{1/2} = E^{\circ} + \frac{RT}{2F} \times \ln([H^{+}]) = f(pH)$$

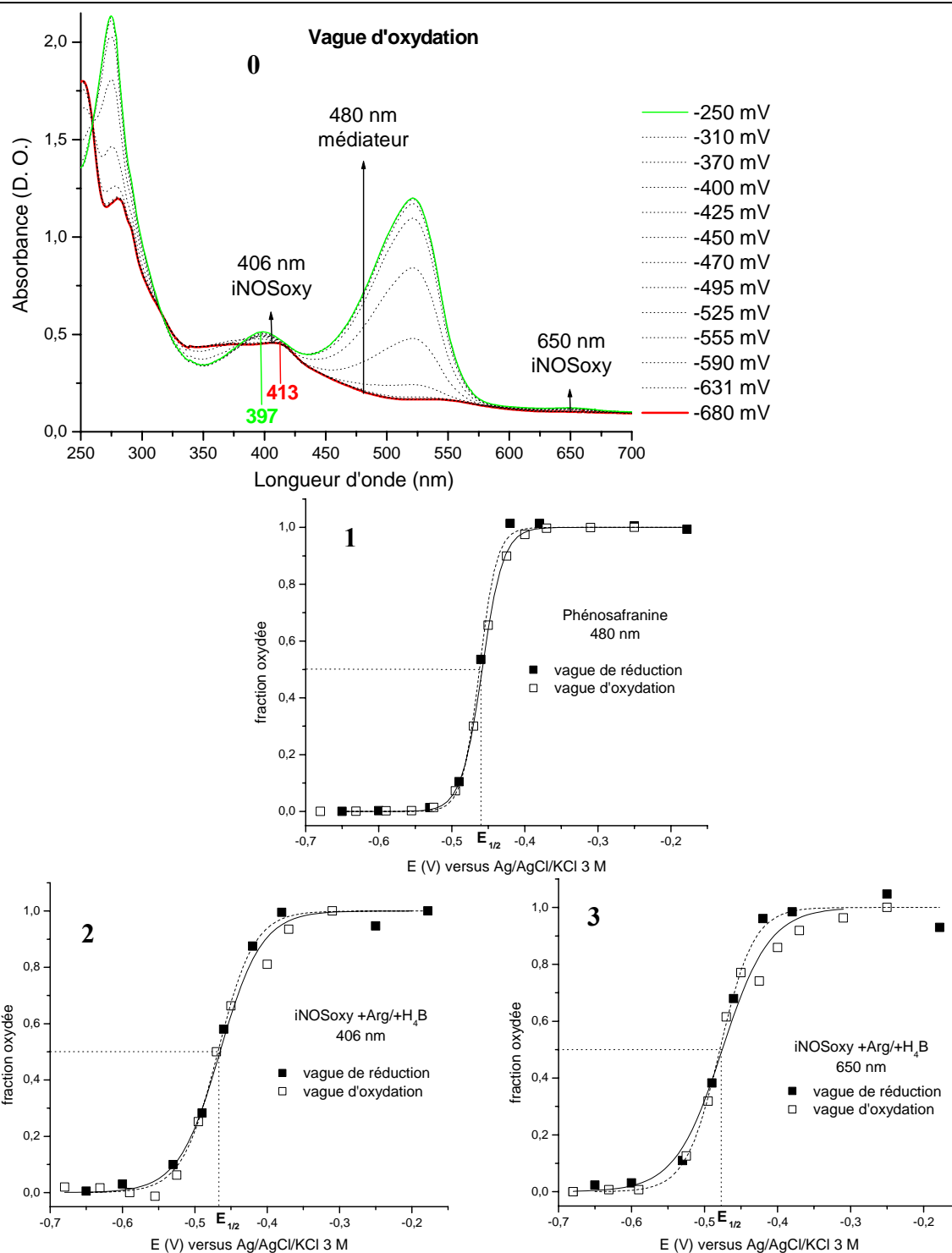


Figure IV.2. Détermination du potentiel $E_{1/2}$ (mV, vs Ag/AgCl/KCl 3 M) du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy (7,2 μM) en conditions saturantes de Arg (5 mM) et H₄B (50 μM) dans KPi 0,1 M plus KCl 0,1 M pH 7,43, en présence de phénosafranine (5 éq. iNOSoxy). **0.** Superposition des spectres d'absorption UV-visible enregistrés à l'équilibre, pour chaque valeur de potentiel appliqué, lors de l'oxydation du complexe Fe^{II} de iNOSoxy + Arg/+H₄B. Le spectre initial de l'espèce Fe^{II} (rouge) présente un maximum d'absorption à 413 nm. Le spectre final (vert) est caractéristique de l'espèce Fe^{III} HS avec un maximum d'absorption à 397 nm. L'évolution de l'absorption représentative de l'oxydation de la protéine est mesurée à 406 et à 650 nm. L'évolution de l'absorption propre à l'oxydation du médiateur est mesurée à 480 nm. Toutes les valeurs d'absorbance sont corrigées par soustraction de l'absorbance mesurée à 820 nm. **1.** Représentation de la fraction de médiateur (phénosafranine) oxydée mesurée à l'équilibre au cours de l'analyse en réduction (■) et en oxydation (□) en fonction du potentiel appliqué. Les résultats sont modélisés à partir de l'équation de Nernst pour déterminer le potentiel $E_{1/2, \text{red}}$ (pointillés) en réduction et $E_{1/2, \text{ox}}$ (trait plein) en oxydation. Cette modélisation des résultats indique également le nombre d'électrons échangés au cours de la réaction. Les résultats obtenus pour iNOSoxy + Arg/+H₄B sont traités de la même façon à 406 nm (**2**) et à 650 nm (**3**).

$$\text{et } E_{1/2} = E^{\circ} + \frac{0,06}{2} \times \log([H^{+}]) = E^{\circ} - 0,03 \times pH$$

Le potentiel $E_{1/2}$ de la phénosafranine doit donc évoluer linéairement en fonction de la valeur du pH. La figure IV.1-B présente nos mesures de $E_{1/2}$ pour la phénosafranine dans KPi 0,1 M plus KCl 0,1 M à différentes valeurs de pH. L'évolution linéaire du potentiel en fonction du pH est retrouvée, et la modélisation de nos résultats indique un potentiel E° pour la phénosafranine autour de -223 mV (*vs* Ag/AgCl/KCl 3 M) et une pente proche de -30 mV, ce qui est en accord avec la théorie.

1.1.2. Etude des espèces HS de iNOSoxy :

Le potentiel d'oxydoréduction du couple Fe^{II} / Fe^{III} HS de iNOSoxy a été mesuré pour différentes combinaisons de substrat et de co-facteurs, à différentes valeurs de pH. L'analyse détaillée de la mesure du potentiel $E_{1/2}$ pour iNOSoxy +Arg/+H₄B à pH 7,43 est présentée ci-après. Le protocole utilisé est le même pour chaque condition expérimentale et est détaillé chapitre II (4.3.1.).

1.1.2.1. iNOSoxy +Arg/+H₄B :

Cette étude a été réalisée avec le seul médiateur phénosafranine dont les caractéristiques ont été présentées ci-dessus (1.1.1.), à raison de 5 éq. par rapport à iNOSoxy. En conditions saturantes de Arg et H₄B, l'enzyme à 7,2 µM, initialement Fe^{III} HS ($\lambda_{\text{Soret}} = 397$ nm), subit une première étape de réduction par diminution progressive du potentiel appliqué dans la solution, de -180 mV à -650 mV (*vs* Ag/AgCl/KCl 3 M). A chaque valeur de potentiel testée, une fois l'équilibre thermodynamique atteint, le spectre d'absorption UV-visible est enregistré. Les valeurs de l'absorbance à 406 et 650 nm, propres à la réduction de iNOSoxy, et à 480 nm, où seule la réduction du médiateur est observée, sont relevées et converties en fraction oxydée d'enzyme et de médiateur (de 1 à 0) (voir chapitre II, 4.3.1.).

Ce protocole est ensuite reproduit en oxydation, le potentiel variant cette fois de -680 à -250 mV, avec des sauts de potentiels plus petits. La figure IV.2-0 présente la superposition des spectres d'absorption UV-visible enregistrés au cours de l'étude en oxydation de iNOSoxy +Arg/+H₄B à pH 7,43. Le maximum d'absorption de l'enzyme se déplace alors de 413 nm (Fe^{II}) à 397 nm (Fe^{III} HS). Les figures IV.2-1-2-3 présentent l'évolution de la fraction oxydée de médiateur (480 nm) et d'enzyme (406 et 650 nm) à l'équilibre, en fonction du potentiel. La reproductibilité de l'expérience est excellente puisque les valeurs sont quasi-

+Arg/+H ₄ B	$E_{1/2, \text{réd}}$ (mV)	$E_{1/2, \text{ox}}$ (mV)
Phénosafranine à 480 nm	-462 ± 1 (n=2,1)	-458 (n=1,7)
iNOSoxy à 406 nm	-468 ± 2 (n=1,0)	-466 ± 3 (n=0,9)
iNOSoxy à 650 nm	-479 ± 2 (n=1,1)	-475 ± 3 (n=0,8)

Table IV.1. Valeurs de potentiel (mV, vs Ag/AgCl/KCl 3 M) déterminées pour la phénosafranine et iNOSoxy en conditions saturantes de Arg et H₄B, lors de l'étude en réduction ($E_{1/2, \text{réd}}$) puis en oxydation ($E_{1/2, \text{ox}}$) dans KPi 0,1 M plus KCl 0,1 M pH = 7,43. Les variations d'absorption spécifiques à la réaction d'oxydoréduction du médiateur sont observées à 480 nm. Les variations d'absorption spécifiques à la réaction d'oxydoréduction de la protéine sont observées à 406 et 650 nm. Le nombre d'électrons échangés au cours de la réaction (n), est indiqué dans chaque cas. Toutes ces valeurs sont issues de la modélisation des résultats présentés figure IV.2-1-2-3, par l'équation de Nernst.

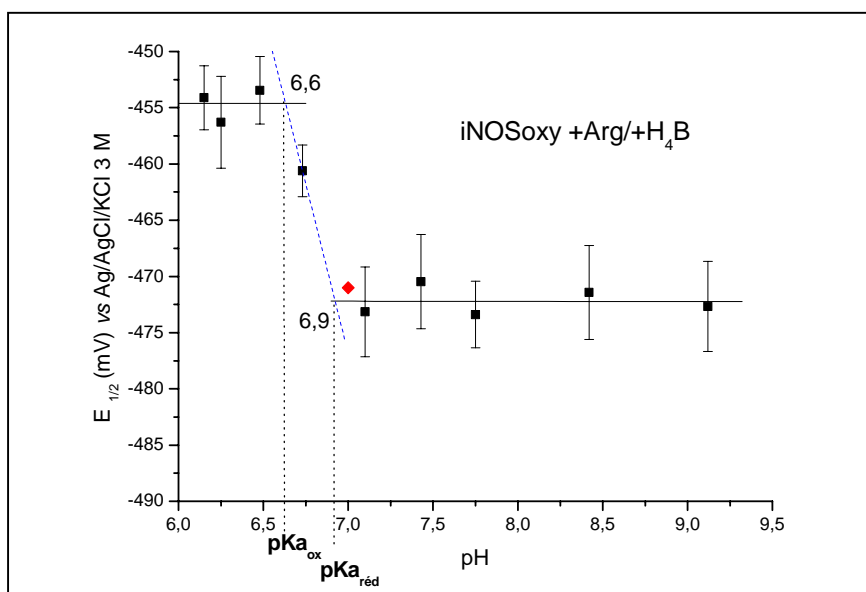


Figure IV.3. Représentation des valeurs de potentiel $E_{1/2}$ (mV, vs Ag/AgCl/KCl 3 M) du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy (7,2 μM) en conditions saturantes de Arg (5 mM) et H₄B (50 μM) dans KPi 0,1 M plus KCl 0,1 M en fonction de la valeur du pH. Chaque point est la moyenne des valeurs de potentiel $E_{1/2, \text{ox}}$ obtenues en oxydation à 406 et 650 nm. Ces expériences ont toutes été réalisées suivant le même protocole, en présence du seul médiateur phénosafranine (5 éq. iNOSoxy). Le losange rouge rapporte la valeur de potentiel déterminée par Presta *et al* [75] pour iNOSoxy +Arg/+H₄B à pH 7,0. En tirets bleus, la droite de pente -60 mV qui simule l'évolution du potentiel $E_{1/2}$ dans le cas de la participation d'un couple acide/base (résidu acide aminé) dans la réaction redox. Les valeurs des $\text{pK}_{\text{a ox}}$ et $\text{pK}_{\text{a réd}}$ associées au couple redox $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ sont déterminées graphiquement à 6,6 et 6,9 respectivement.

superposables, que l'expérience ait été menée en réduction ou en oxydation. La table IV.1 rapporte les potentiels $E_{1/2, \text{réd}}$ et $E_{1/2, \text{ox}}$ obtenus par modélisation de nos résultats avec l'équation de Nernst (voir chapitre II, 4.3.1.) lors de l'étude en réduction et en oxydation respectivement.

Différentes observations permettent de créditer la mesure du potentiel de iNOSoxy d'un bon indice de confiance. Tout d'abord, les valeurs de potentiels $E_{1/2, \text{réd}}$ et $E_{1/2, \text{ox}}$ déterminées à chaque longueur d'onde sont très proches. De plus, le nombre d'électrons échangés au cours de la réaction d'oxydoréduction du médiateur ($n \approx 2$) et de la protéine ($n \approx 1$), déterminé par la modélisation, est satisfaisant. Les potentiels mesurés en réduction sont, de manière générale, légèrement inférieurs à ceux déterminés en oxydation. Ceci peut être dû à la présence de traces d'oxygène dans la solution de départ, consommées au cours de l'étude en réduction. La valeur du potentiel $E_{1/2, \text{ox}}$, obtenue pour le médiateur en oxydation, correspondant parfaitement à celle déterminée lors de l'étude du médiateur seul en solution (voir 1.1.1.), nous faisons le choix de retenir pour la protéine les valeurs obtenues lors de l'étude en oxydation ($E_{1/2, \text{ox}}$).

Enfin, les potentiels déterminés pour iNOSoxy à 406 et 650 nm sont proches, mais séparés de 9 mV. Cette différence peut être due à un effet de diffusion lié à une légère dégradation de la protéine au cours de l'expérience et qui affecterait les spectres d'absorption, particulièrement à 406 nm qui est proche de la zone UV. D'un autre côté, les expériences sont menées à $\approx 7 \mu\text{M}$ iNOSoxy, ce qui fait que les variations d'absorption à 650 nm sont faibles. Il est donc difficile de choisir une valeur de potentiel plutôt que l'autre. Ainsi nous retiendrons la moyenne des $E_{1/2, \text{ox}}$ obtenus pour iNOSoxy à 406 et 650 nm.

La même expérience a été réalisée à différentes valeurs de pH, de 6,15 à 9,12. La figure IV.3 présente la moyenne des valeurs de potentiel déterminées en oxydation ($E_{1/2, \text{ox}}$) à 406 et 650 nm pour iNOSoxy + Arg/+H₄B, en fonction du pH de l'expérience.

Les potentiels mesurés à $\text{pH} \geq 7,1$ semblent être constants, avec une valeur moyenne calculée à $-472 \text{ mV} \pm 4 \text{ mV}$ (vs Ag/AgCl/KCl 3 M). Ce résultat correspond parfaitement au potentiel déterminé par A. Presta pour iNOSoxy + Arg/+H₄B à pH 7,0 (-471 mV) [75]. En deçà de pH 7,0, le potentiel redox de iNOSoxy semble augmenter de +15 à +20 mV pour se stabiliser autour de -455 mV vers pH 6,5. Cette dépendance en pH rappelle la courbe de titrage d'un couple acide/base. La réaction redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ n'implique pas de transfert de proton, et les trois pKa de H₄B se situent à 1,3, 5,6 et 10,6 [92], ce qui exclut, *a priori*, la participation de H₄B. Ainsi nous suggérons qu'un résidu acide aminé, sous sa forme protonée, puisse stabiliser la forme Fe^{II} de iNOSoxy + Arg/+H₄B, avec pour effet d'augmenter la valeur du

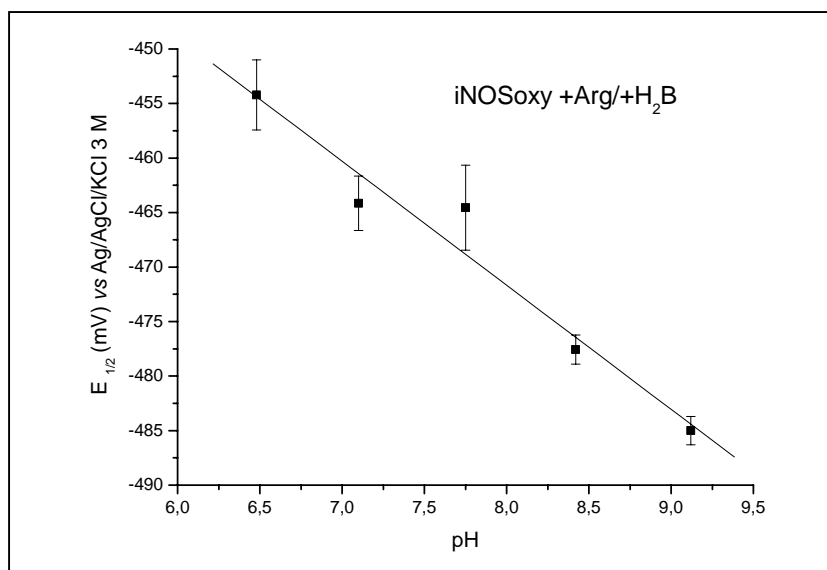


Figure IV.4. Représentation des valeurs de potentiel $E_{1/2}$ (mV, vs Ag/AgCl/KCl 3 M) du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy (6,6 μM) en conditions saturantes de Arg (5 mM) et H_2B (50 μM) dans KPi 0,1 M plus KCl 0,1 M en fonction de la valeur du pH. Chaque point est la moyenne des valeurs de potentiel $E_{1/2, \text{ox}}$ obtenues en oxydation à 406 et 650 nm. Ces expériences ont toutes été réalisées suivant le même protocole, en présence du seul médiateur phénosafranine (5 éq. iNOSoxy). Les résultats ont été modélisés par une droite d'équation : $Y = -380,7 - 11,4 \cdot X$.

potentiel de l'hème. Pour valider cette hypothèse il faudrait plus de points dans la zone de pH comprise entre 6,4 et 7,1. La modélisation de $E_{1/2}$ en fonction du pH avec une courbe de titrage permettrait alors de déterminer les valeurs des constantes $\text{pK}_{\text{a}_{\text{ox}}}$ et $\text{pK}_{\text{a}_{\text{red}}}$ associées au couple redox. Une approximation graphique de ces valeurs autour de 6,6 et 6,9 est proposée figure IV.3, par simulation d'une droite de pente -60 mV passant par le potentiel déterminé à pH 6,73 (tirets bleus), et qui théoriquement devrait approcher la courbe de titrage en son point d'inflexion. L'histidine a un pK_{a} compris entre 6 et 7, cependant la structure cristallographique de iNOSoxy ne présente pas un tel résidu au site actif, qui comporte plutôt des résidus tyrosine, glutamate, tryptophane et phénylalanine. Nous suggérons que le ligand cystéine proximal, en interaction de liaison hydrogène avec un résidu tryptophane et qui contrôle la réactivité des NOSs, puisse être impliqué dans cette réaction d'oxydoréduction. Enfin, en dehors de la zone de titrage décrite ($6,6 < \text{pH} < 6,9$), le potentiel redox de iNOSoxy +Arg/+H₄B semble constant ce qui confirme l'absence de la molécule d'eau du site actif lorsque l'enzyme est en condition saturante de Arg et H₄B.

1.1.2.2. iNOSoxy +Arg/+H₂B :

Pour discriminer entre les rôles redox et structural de H₄B, de nombreux travaux utilisent un analogue structural non redox actif du co-facteur naturel des NOSs : H₂B. Dès lors, la même expérience de détermination du potentiel a été réalisée à partir de iNOSoxy +Arg/+H₂B, en présence de phénosafranine seule. Les spectres d'absorption enregistrés lors de l'étude en oxydation à une valeur de pH (8,42) ainsi que le traitement des données sont présentés en annexe (7.1.). C'est la première fois que le potentiel de ce couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy est déterminé.

La figure IV.4 présente l'évolution du potentiel redox $E_{1/2}$ en fonction du pH. Le comportement observé est très différent de celui de iNOSoxy +Arg/+H₄B. En effet, le potentiel redox semble évoluer linéairement entre les valeurs de pH testées (de 6,48 à 9,12), suivant une pente de -11 mV. Ces résultats suggèrent une stabilisation du potentiel de iNOSoxy +Arg à $\text{pH} \geq 7$, permise par H₄B et non par H₂B. Cette hypothèse implique que le comportement observé pour le potentiel de iNOSoxy +Arg/+H₂B soit représentatif de celui de iNOSoxy +Arg, ce qui ne peut être confirmé que par l'étude de l'évolution du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy +Arg sur la gamme de pH testée.

A. Presta a déterminé pour iNOSoxy +Arg un potentiel à -443 mV à pH 7,0 [75] et l'extrapolation linéaire de nos résultats indique un potentiel de -461 mV pour iNOSoxy +Arg/+H₂B. Ceci nous permet de calculer le rapport des constantes de dissociation de H₂B

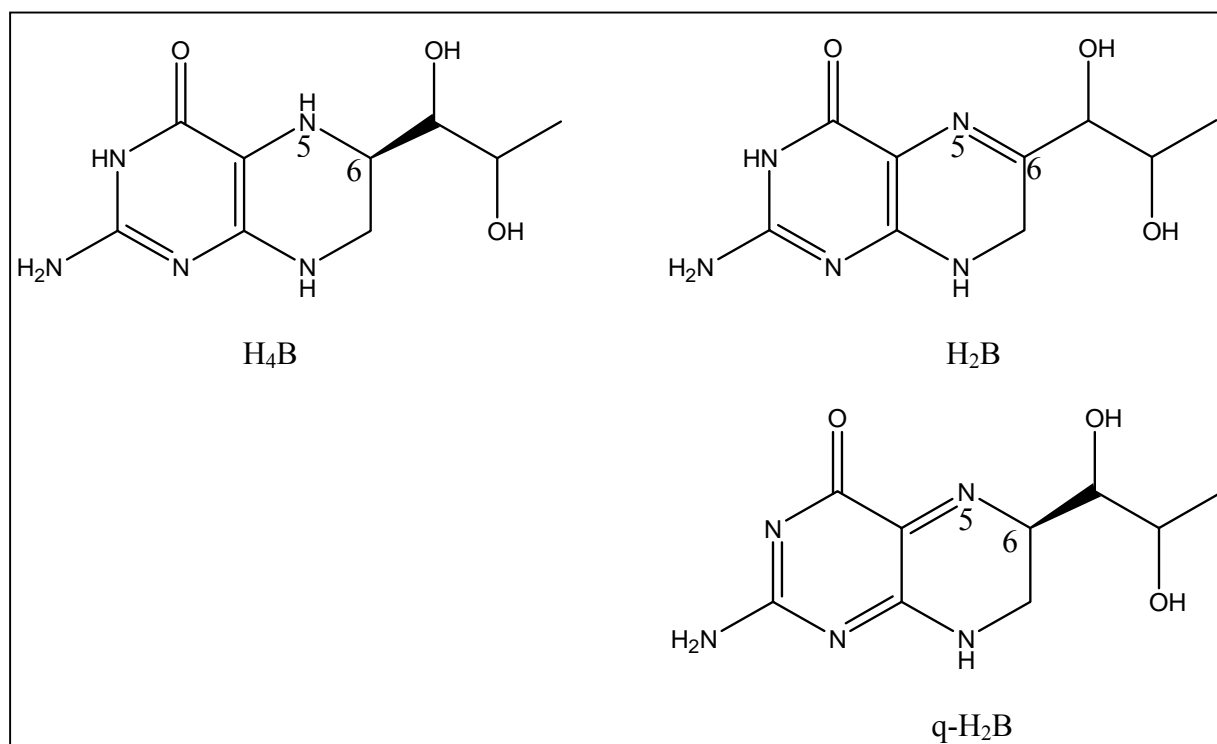


Figure IV.5. Représentation des co-facteurs H_4B (5,6,7,8-tetrahydrobioptérine), H_2B (7,8-dihydrobioptérine) et de la forme quinonoïde de H_2B ($\text{q-H}_2\text{B}$). Le pK_a en $\text{N}5$ est de 5,6 pour H_4B , de 4,2 pour H_2B , et ≈ 5 pour $\text{q-H}_2\text{B}$ [182].

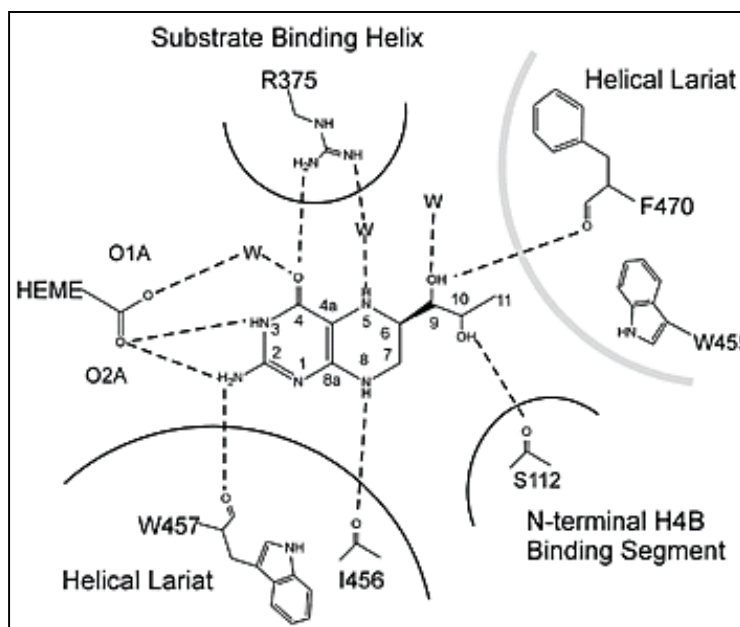


Figure IV.6. Interactions créées par le co-facteur H_4B fixé au dimère de iNOSoxy. H_4B est impliqué dans un réseau de liaisons hydrogène stabilisant la conformation : 1) de l'hème par les propionates (HEME); 2) de l'hélice de fixation du substrat (Substrate Binding Helix); 3) du segment N-terminal de iNOSoxy (N-terminal H_4B Binding Segment); 4) du dimère (Helical Lariat). Figure issue de la revue de C.-C. Wei *et al* [92].

pour iNOSoxy +Arg à $K_{\text{D, ox}}/K_{\text{D, red}} \approx 0,5$ à pH 7,0 (voir chapitre II, 4.3.2.). Le même calcul posé pour H_4B donne $K_{\text{D, ox}}/K_{\text{D, red}} \approx 0,3$. Ces résultats suggèrent que tout comme H_4B , H_2B a une meilleure affinité pour la forme Fe^{III} que pour la forme Fe^{II} de iNOSoxy +Arg.

La figure IV.5 présente les co-facteurs H_4B et H_2B . Leurs différences résident en 2 points : 1) l'existence d'un proton échangeable sur l'azote N5 de H_4B ; 2) la stéréochimie du carbone C6 (sp^3 (R) pour H_4B et sp^2 (Z) pour H_2B). Une récente publication confirme la spécificité de H_4B sur ces deux points pour son bon fonctionnement au sein des NOSs [183]. La figure IV.6 présente les interactions de H_4B avec le squelette protéique [92]. Le proton du N5 de H_4B est impliqué dans un réseau de liaisons H interagissant avec l'arginine R375 de l'hélice de fixation du substrat, et la stéréochimie du carbone C6-(R) permet la stabilisation du segment N-terminal de iNOSoxy et de sa structure en dimère. H_2B ne peut satisfaire l'ensemble de ces interactions, qui stabilisent la structure protéique. Or nous observons que le potentiel redox est constant dans le cas de iNOSoxy +Arg/ H_4B , et non dans le cas de iNOSoxy +Arg/ H_2B . Ainsi nous proposons que la différence de comportement observée pour le potentiel redox puisse rendre compte d'une stabilisation de la structure de iNOSoxy +Arg en présence de H_4B , par création de liaisons hydrogène avec certains résidus-clef environnants, impossible en présence de H_2B . Si l'expérience confirme que l'évolution du potentiel redox de iNOSoxy +Arg suit le comportement de iNOSoxy +Arg/ H_2B , nous pourrions penser que le caractère constant du potentiel redox de iNOSoxy +Arg/ H_4B est intrinsèquement lié à la stabilisation du site de fixation de Arg, par interaction de H_4B avec le résidu R375 (fig. IV.6).

La structure cristallographique de iNOSoxy, réalisée à partir de H_4B et H_2B , ne permet pas de mettre en évidence ces divergences puisque les auteurs, probablement du fait de leurs conditions expérimentales, n'ont pas observé la fixation de H_2B au site catalytique mais de sa forme quinonoïde q- H_2B , représentée figure IV.5 [184]. Néanmoins, nos résultats semblent remettre en question l'utilisation de H_2B en tant qu'analogue structural du co-facteur naturel des NOSs H_4B .

1.1.2.3. iNOSoxy + H_4B :

L'étude de l'évolution du potentiel de iNOSoxy en condition saturante du co-facteur H_4B seul a ensuite été réalisée pour des valeurs de pH comprises entre 6,48 et 8,80. La phénosafranine seule ne suffit pas pour assurer la réduction totale de iNOSoxy + H_4B en deçà de pH 8,0 donc d'autres médiateurs ont été utilisés, seuls ou en mélange pour déterminer le potentiel de la protéine. Ainsi le rouge neutre a été utilisé pour déterminer le potentiel à pH 7,75. Ce médiateur ne présentant pas le point isobestique de la phénosafranine à 406 nm, la quantité de

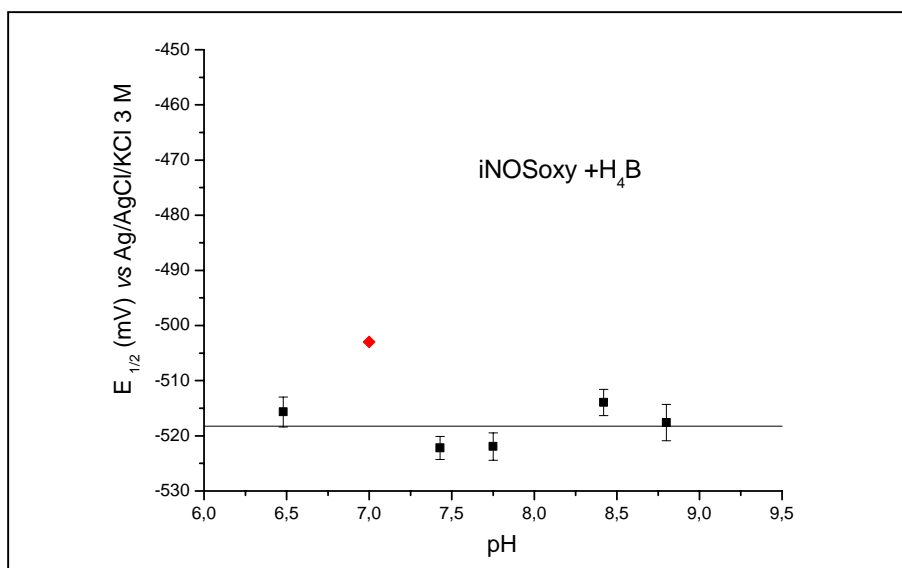


Figure IV.7. Représentation des valeurs de potentiel $E_{1/2}$ (mV, vs Ag/AgCl/KCl 3 M) du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy (30 μM) en condition saturante de H_4B (80 μM) dans KPi 0,1 M plus KCl 0,1 M en fonction de la valeur du pH. Les valeurs de potentiel $E_{1/2}$ ont été obtenues en oxydation à 650 nm. A chaque valeur de pH le mélange de médiateurs est différent. A pH 8,80 et 8,42 : 1,7 éq. (iNOSoxy) phénosafranine ; à pH 7,75 : 1,3 éq. rouge neutre ; à pH 7,43 : 1,3 éq. rouge neutre + 1 μM benzylviologène ; à pH 6,48 : 1,2 éq. phénosafranine + 5 μM benzylviologène + 2 μM méthylviologène. Le losange rouge rapporte la valeur de potentiel déterminée par Presta *et al* [75] pour iNOSoxy + H_4B à pH 7,0.

pH	$E_{1/2}$ (mV) iNOSoxy +Arg/+ H_4B	$E_{1/2}$ (mV) iNOSoxy +Arg/+ H_2B	$E_{1/2}$ (mV) iNOSoxy + H_4B
6,15	- 454 \pm 3 (n=1,1)	n. d.	n. d.
6,25	- 456 \pm 4 (n=1,3)	n. d.	n. d.
6,48	- 454 \pm 3 (n=1,1)	- 454 \pm 3 (n=1,1)	- 516 \pm 3 (n=1,0)
6,73	- 461 \pm 2 (n=1,1)	n. d.	n. d.
7,1	- 473 \pm 4 (n=1,0)	- 464 \pm 3 (n=1,2)	n. d.
7,43	- 471 \pm 4 (n=0,9)	n. d.	- 522 \pm 2 (n=0,9)
7,75	- 473 \pm 3 (n=1,1)	- 465 \pm 4 (n=1,0)	- 522 \pm 3 (n=1,0)
8,42	- 471 \pm 4 (n=1,0)	- 478 \pm 1 (n=0,9)	- 514 \pm 2 (n=1,0)
8,80	n. d.	n. d.	- 518 \pm 3 (n=1,0)
9,12	- 473 \pm 4 (n=1,1)	- 485 \pm 1 (n=0,9)	n. d.

Table IV.2. Tableau récapitulatif des valeurs de potentiel $E_{1/2}$ (mV, vs Ag/AgCl/KCl 3 M) déterminées pour les espèces HS de iNOSoxy dans différentes conditions de pH et d'environnement de l'hème.

protéine a été augmentée à 30 μM pour permettre la mesure non ambiguë du potentiel sur les seules variations de l'absorption à 650 nm. Pour la mesure à pH 7,43, 1 μM benzylviologène a été ajouté à la solution de rouge neutre pour stabiliser les bas potentiels. Le benzylviologène présente une absorption à 650 nm qui est cependant tout à fait négligeable dans ces conditions de rapport de concentrations. En deçà de pH 7,4, le rouge neutre co-existe sous plusieurs formes ce qui le rend inutilisable pour la détermination précise du potentiel de iNOSoxy [185]. Le potentiel de iNOSoxy + H_4B à pH 6,48 a donc été déterminé avec une solution de phénosafranine, enrichie de 5 μM benzylviologène et 2 μM méthylviologène pour stabiliser les potentiels les plus bas. Il a été vérifié que, dans ces conditions de concentration par rapport à iNOSoxy, l'absorption des viologènes à 650 nm est négligeable (voir chapitre II, 4.3.1., table II.3). Les spectres d'absorption enregistrés lors de l'étude en oxydation à une valeur de pH (6,48) ainsi que le traitement des données sont présentés en annexes (7.2.).

La figure IV.7 présente les résultats obtenus en fonction de la valeur du pH. Le potentiel de iNOSoxy en présence du co-facteur H_4B semble être constant entre les pH 6,48 et 8,80. La moyenne des potentiels est calculée à -518 mV (*vs* Ag/AgCl/KCl 3 M), valeur inférieure de 15 mV à celle déterminée par Presta *et al* à pH 7,0 (-503 mV) [75]. Connaissant la valeur de la constante de dissociation de H_4B pour la forme oxydée de l'hème ($K_{\text{D, ox}} = 0,6 \mu\text{M}$) [186], nous déterminons la constante de dissociation apparente de H_4B pour la forme réduite de iNOSoxy à $K_{\text{D, red}} = 0,14 \mu\text{M}$ (voir chapitre II, 4.3.2.). Cette valeur est proche mais 1,8 fois supérieure à celle précédemment déterminée par Presta *et al* (0,08 μM) [75].

Cette expérience nous permet également de déterminer le rapport des constantes de dissociation de Arg pour les formes oxydée et réduite de iNOSoxy + H_4B . Ainsi, à partir des potentiels calculés précédemment pour iNOSoxy + Arg + H_4B (voir 1.1.2.1.), nous obtenons $K_{\text{D, ox}} / K_{\text{D, red}} \approx 6,2$ à pH > 7, et $K_{\text{D, ox}} / K_{\text{D, red}} \approx 12,1$ à pH < 6,5.

Enfin, la non-dépendance en pH observée pour le potentiel redox de iNOSoxy + H_4B est un argument fort pour dire qu'en présence du co-facteur H_4B seul, le complexe Fe^{III} HS de iNOSoxy est 5-coordonné. En effet, la fixation de H_4B semble suffire à chasser la molécule d'eau portée par le fer de l'enzyme native.

Notre dispositif de spectroélectrochimie a permis la mesure fiable des potentiels redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy dans différentes conditions de substrat et de co-facteur (table IV.2). Pour la première fois cette étude a été réalisée en fonction du pH sur la protéine libre en solution. La dépendance au pH du potentiel redox est intrinsèquement liée à l'environnement de l'hème. Ainsi, nos résultats suggèrent l'intervention d'un résidu acide aminé, avec un pKa

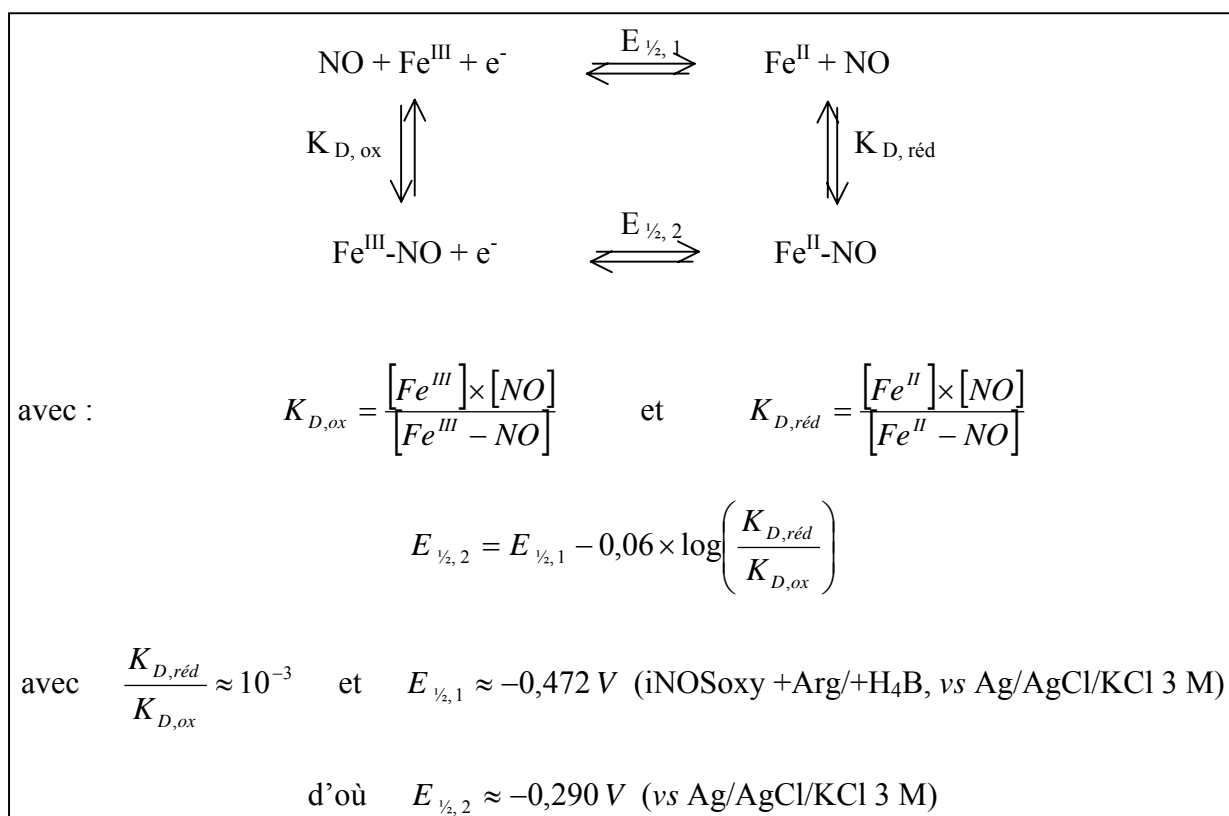


Figure IV.8. Cycle thermodynamique et calcul simple permettant l'estimation du potentiel d'oxydoréduction du couple Fe^{II}-NO/Fe^{III}-NO ($E_{1/2,2}$) pour iNOSoxy + Arg/+H₄B. Le rapport des constantes de dissociations ($K_{D, \text{réd}} / K_{D, \text{ox}}$) pour NO a été déterminé à partir des valeurs des k_{on} et k_{off} de NO calculées pour les formes Fe^{III} et Fe^{II} de iNOSoxy + Arg/+H₄B [97, 187]. La valeur du potentiel d'oxydoréduction du couple Fe^{II}/Fe^{III} de iNOSoxy + Arg/+H₄B ($E_{1/2,1}$) a été calculée à -0,472 V vs Ag/AgCl/KCl 3 M (voir 3.1.2.1.).

proche de 6,75, qui stabiliserait la forme Fe^{II} de iNOSoxy +Arg/+H₄B à pH acide. Le co-facteur H₄B lui semble permettre une stabilisation du potentiel de iNOSoxy +Arg pour les valeurs de pH supérieures à 7, non permise par H₂B. Ces observations, pour être validées, requièrent une étude de l'évolution du potentiel de iNOSoxy +Arg en fonction du pH. De plus, cette étude réalisée sur l'enzyme native et en condition saturante de H₂B, permettrait la détermination des constantes de dissociation en fonction du pH pour chaque espèce.

1.2. Difficultés liées à la mesure du potentiel d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$:

T. W. Ost a été le premier à tenter la mesure du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ par spectroélectrochimie pour l'isoforme neuronale de NOS [179]. Cependant, une lecture attentive de son article indique que : 1) leur système n'atteint jamais l'équilibre thermodynamique (premier critère à satisfaire pour valider une expérience de spectroélectrochimie) ; 2) NO est consommé à l'électrode au cours de l'expérience, jusqu'à épuisement ; 3) les spectres d'absorption enregistrés ne représentent pas les complexes $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de nNOSoxy ; 4) la mesure du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de l'enzyme n'est pas directe puisque les auteurs observent la conversion $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$ de l'enzyme. Autrement dit, il semble que les auteurs n'auraient pas pu déterminer le potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de nNOSoxy sans estimation préalable de sa valeur théorique. Ainsi, nous proposons d'appliquer notre protocole à la mesure du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de iNOSoxy.

L'estimation théorique du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ est basée sur un calcul simple présenté figure IV.8. Cette valeur est déterminée autour de -290 mV (*vs* Ag/AgCl/KCl 3 M) pour iNOSoxy +Arg/+H₄B. La mesure précise du potentiel par spectroélectrochimie implique de trouver le bon médiateur, qui réponde aux différents critères développés en introduction de la partie (1.1.). Dans un premier temps nous avons donc testé différents médiateurs dont le potentiel redox pouvait encadrer celui du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de iNOSoxy +Arg/+H₄B, puis nous avons essayé de mesurer le potentiel redox de la protéine en atmosphère saturée de NO.

Médiateur	$E_{1/2}$ (mV)	n	Stabilité en présence de NO
Naphtoquinone	-180	2	Non
Indigo trisulfonate	-290	2	Non
Méthylviologène	-657	1	Oui
Benzylviologène	-567	1	Oui
$[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]$	-158	1	Non
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$	+230	1	Oui
$[\text{Os}^{\text{III}}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}_2]$	-121	1	Oui

Table IV.3. Tous les potentiels redox ($E_{1/2}$, mV) ont été mesurés dans KPi 0,1 M plus KCl 0,1 M pH 7,4 contre une électrode de référence Ag/AgCl/KCl 3 M.

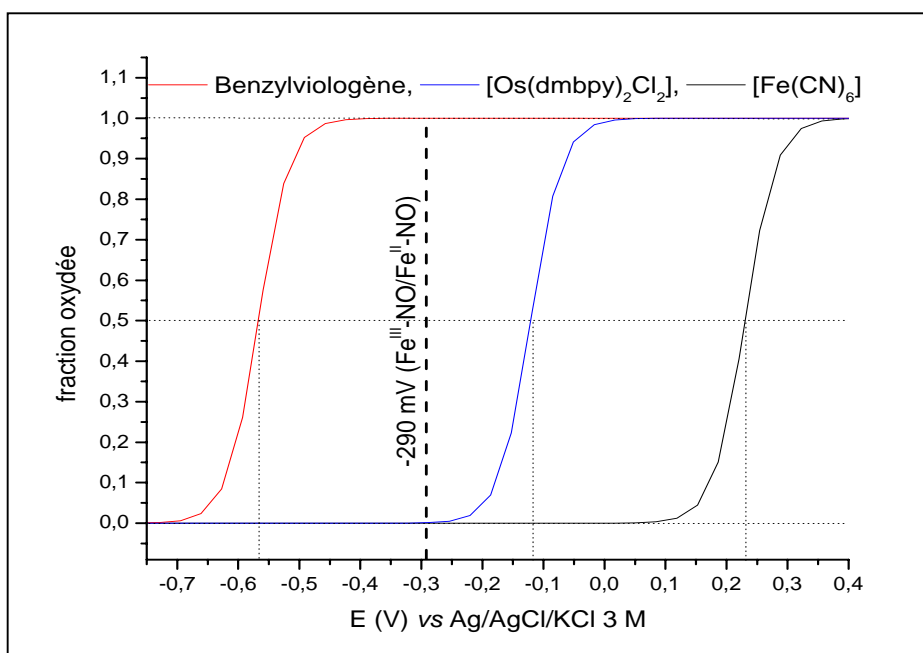


Figure IV.9. Courbes d'oxydoréduction des médiateurs utilisés pour la transformation réversible du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de iNOSoxy + Arg/+H₄B à pH 7,4 : le benzylviologène (rouge), le complexe d'osmium $[\text{Os}^{\text{III}}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}_2]$ (bleu), et le ferricyanure (noir). Tous sont inertes au NO. Leurs potentiels redox sont indiqués table IV.3.

1.2.1. Etude de la stabilité des médiateurs :

La table IV.3 présente les caractéristiques électrochimiques des différents médiateurs testés. Les quinones couvrent très exactement la gamme de potentiels où est attendu celui du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de iNOSoxy +Arg/+H₄B. Malheureusement l'expérience d'oxydoréduction réalisée avec la naphthoquinone et l'indigo trisulfonate en présence de NO a montré que la forme réduite des quinones réagit de manière irréversible avec le radical NO. Cette famille de médiateurs a donc été écartée.

Différents complexes inorganiques, fournis par le laboratoire d'Electrochimie Moléculaire de Paris VII, ont ensuite été testés. Le complexe $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]$ ($E^\circ = -158 \text{ mV}$ vs Ag/AgCl/KCl 3 M) réagit irréversiblement avec NO pour former un nouveau complexe avec un maximum d'absorption à 354 nm. Il a donc été éliminé de notre étude.

Les complexes ferro/ferricyanure et $[\text{Os}^{\text{II}}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}_2]/[\text{Os}^{\text{III}}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}_2]$, eux, semblent stables en présence de NO. Leurs potentiels redox, mesurés à +230 mV et -121 mV (vs Ag/AgCl/KCl 3 M) paraissent cependant trop élevés pour assurer un transfert d'électron progressif au couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de la protéine. De même, les viologènes (méthyl- et benzyl-) sont des réducteurs forts, inertes au NO. Ainsi, nous avons choisi de tester notre dispositif électrochimique avec un mélange de médiateurs, en atmosphère saturée de NO, pour la transformation réversible du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de iNOSoxy +Arg/+H₄B. La figure IV.9 présente les courbes d'oxydoréduction des médiateurs testés : le benzylviologène, le complexe $[\text{Os}^{\text{III}}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}_2]$ et le ferricyanure. L'impossibilité théorique d'accéder à la mesure du potentiel redox de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ avec ces médiateurs est mise en évidence puisqu'ils ne couvrent pas la valeur de potentiel théorique que nous avons calculée pour l'enzyme.

1.2.2. Expérience d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de iNOSoxy :

L'expérience a été réalisée à deux reprises, à partir d'un mélange ferricyanure-benzylviologène, et à partir d'un mélange $[\text{Os}^{\text{III}}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}_2]$ -benzylviologène. Les mêmes résultats ont été obtenus dans les deux cas. La figure IV.10 présente les spectres d'absorption enregistrés lors de la transformation réversible du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ en $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ par spectroélectrochimie en présence de ferricyanure et de benzylviologène.

Un spectre d'absorption a été enregistré pour vérifier l'état de la protéine ($\lambda_{\text{Soret}} = 397 \text{ nm}$, spectre bleu) avant substitution de l'atmosphère d'argon par du NO. Après ajout du NO, la formation progressive du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ est observée sur 5 min. Ce complexe semble stable, au moins sur 15 min, malgré l'excès de NO dans la cellule (fig. IV.10, spectre vert).

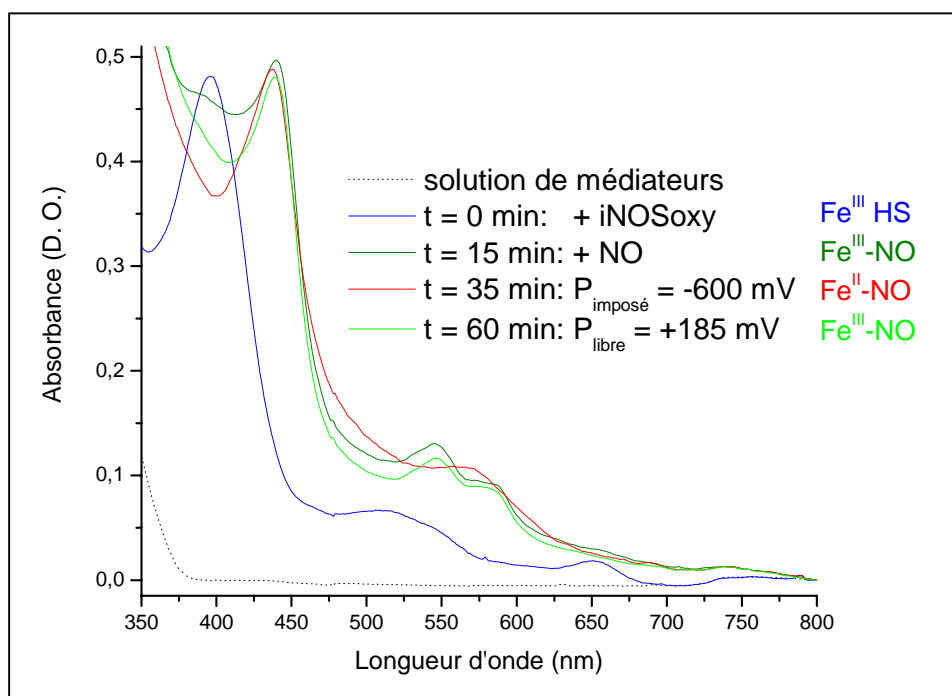


Figure IV.10. Superposition des spectres d'absorption UV-visible enregistrés lors de l'expérience d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de iNOSoxy ($7,2 \mu\text{M}$) en conditions saturantes de Arg (5 mM) et H_4B ($50 \mu\text{M}$) et en présence de 10 mM ferricyanure et 5 mM benzylviologène, dans KPi $0,1 \text{ M}$ plus KCl $0,1 \text{ M}$ pH $7,4$. Sont présentés les spectres d'absorption de la solution de médiateurs dans les conditions de l'expérience (noir, pointillés), après ajout de l'enzyme (bleu), après ajout de NO gaz en surpression dans la cellule (vert foncé), une fois l'équilibre atteint après application d'un potentiel réducteur dans la solution (rouge, $P_{\text{imposé}} = -600 \text{ mV}$), puis application d'un potentiel oxydant pendant 25 min (vert, mesure du potentiel libre à $+185 \text{ mV}$). Tous les potentiels sont mesurés contre une électrode de référence Ag/AgCl/KCl 3 M .

Un potentiel réducteur (-600 mV) est alors imposé dans la solution pendant 20 min. Nous observons la formation stable du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ (fig. IV.10, spectre rouge). Un potentiel oxydant (+250 mV) est alors imposé dans la solution pendant 25 min avant de laisser le système s'équilibrer. Nous observons le retour de iNOSoxy à la forme $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ alors que le potentiel s'est stabilisé autour de +185 mV (vs Ag/AgCl/KCl 3 M). Les mêmes spectres d'absorption ont été enregistrés lorsque la réaction a été menée avec le mélange de médiateurs $[\text{Os}^{\text{III}}(\text{dmbpy})_2\text{Cl}_2]\text{-benzylviologène}$.

Le point très positif de cette expérience est de constater que nos conditions expérimentales permettent la formation d'un complexe stable $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$, et sa réduction réversible en $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$, stable lui aussi. Le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ étant particulièrement sensible à la présence d'oxygène, ces résultats indiquent que la cellule de spectroélectrochimie est parfaitement étanche aux gaz. Ces observations diffèrent de celles présentées par T. W. Ost, essentiellement car dans ses conditions expérimentales le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ n'était pas stable. En effet, la constante de dissociation du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ est élevée [97] donc sans atmosphère saturée en NO au dessus de la solution, l'oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ forme un complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ qui se dissocie instantanément. Ainsi c'est la transformation $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$ qui est observée. T. W. Ost indique que NO est réduit par son électrode en NO^- ce qui empêche l'équilibre de son système, par consommation du NO jusqu'à épuisement. Nous n'avons pas observé un tel phénomène. Cependant, à imaginer que dans nos conditions la réduction du NO ait également lieu : 1) elle se fait sur une échelle de temps qui ne semble pas affecter l'équilibre de notre système (stabilité de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$) ; 2) elle ne perturbe pas la mesure des potentiels. En effet dans nos conditions expérimentales, lors de l'étude de réducteurs forts tels que les viologènes, le potentiel mesuré pour les médiateurs est le même en absence et en présence de NO. Tous ces résultats prouvent que, dans nos conditions expérimentales, ni l'atmosphère saturée en NO ni l'éventuelle réduction du NO à l'électrode, n'empêchent la mesure fiable du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ des NOSs. La valeur classiquement attribuée au potentiel redox du couple NO/NO^- a récemment été révisée autour de $-0,8 \text{ V} \pm 0,2 \text{ V}$ par rapport à ENH [188], soit $\approx -1 \text{ V}$ par rapport à Ag/AgCl/KCl 3 M. Ce potentiel est très bas et n'a été atteint ni par T. W. Ost, ni par nous, lors de l'étude du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ des NOSs. Le mélange de médiateurs utilisé par T. W. Ost contenant des composés type quinone (FMN, naphtoquinone), nous proposons que la réaction parasite qu'il a observée, et qui le place en condition de non-équilibre thermodynamique, soit non pas la réduction de NO à l'électrode mais la réaction irréversible des quinones réduites en solution avec NO (voir 1.2.1.).

Quel que soit le système de médiateurs utilisé, et comme attendu (voir 1.2.1., fig. IV.9), la construction progressive des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ et $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$, par incrémentation du potentiel imposé en solution, s'est avérée impossible. En effet, le complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ ne se réduit pas tant que le benzylviologène n'est pas réduit, ce qui correspond à une valeur de potentiel où 100 % du $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ est formé. De même, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ ne s'oxyde pas tant que le ferrocyanure ou l'osmium n'est pas oxydé, ce qui correspond à une valeur de potentiel où 100 % du $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ est formé. Les médiateurs utilisés ne permettant pas de stabiliser la zone de potentiels compris entre -400 et -250 mV, ces observations confirment notre estimation du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de iNOSoxy +Arg/+H₄B, vraisemblablement autour de -290 mV.

Maintenant que nous avons démontré la capacité de notre système à réaliser la transformation réversible du complexe $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de iNOSoxy en $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ par spectroélectrochimie, il reste à trouver le bon médiateur pour pouvoir mesurer, avec précision, le potentiel du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de iNOSoxy, dans différentes conditions de substrat et de co-facteur. Sur la base des recherches que nous avons menées, un centre métallique type osmium semble être un bon candidat pour envisager la synthèse de nouveaux composés inorganiques redox actifs, et à terme la détermination du potentiel d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$.

1.3. Discussion et perspectives :

Nous avons pour la première fois réalisé une étude de l'évolution du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy en fonction du pH, dans différentes conditions d'environnement de l'hème. Mises à part les expériences menées en condition saturante du co-facteur H₄B pour lesquelles l'addition de viologènes a été requise pour stabiliser les potentiels les plus bas, tous les potentiels $E_{1/2}$ ont été déterminés à l'aide d'un seul médiateur (phénosafranine, rouge neutre ou benzylviologène). Ceci a permis une analyse fiable et une détermination précise des potentiels d'oxydoréduction des différents complexes de iNOSoxy étudiés. Pour chaque condition de pH testée, la validité de la mesure est renforcée par la mesure simultanée du potentiel redox, connu, du médiateur utilisé pour la réaction.

Le potentiel des différentes espèces HS étudiées présente un comportement très différent en fonction de l'environnement de l'hème. En effet, il semble que le potentiel de iNOSoxy +Arg/+H₄B soit constant au-delà de pH 7 (-472 mV *vs* Ag/AgCl/KCl 3 M) mais augmente à pH plus acide. Ceci pourrait indiquer la participation d'un résidu acide aminé dans la réaction,

qui stabiliserait la forme réduite de l'enzyme à bas pH. Cette hypothèse doit être vérifiée par mesure du potentiel pour un plus grand nombre de valeurs de pH entre 6,4 et 7,1. Ensuite, la nature du résidu acide aminé engagé dans la réaction pourrait être identifiée par comparaison des spectres infrarouge du complexe $\text{iNOSoxy} + \text{Arg}/+\text{H}_4\text{B}$ aux pH 6,4 et 7,4.

La dépendance en pH du potentiel de l'espèce $\text{iNOSoxy} + \text{Arg}/+\text{H}_2\text{B}$ présente un comportement tout à fait différent puisqu'il semble varier sur toute la gamme de pH étudiée. La valeur de la pente obtenue par modélisation linéaire de nos résultats (≈ -11 mV) ne nous permet pas de conclure sur l'origine de ce phénomène. Cependant cette observation suggère que la substitution du co-facteur naturel des NOSs (H_4B) par son analogue non redox actif H_2B , influence les propriétés physicochimiques de l'hème, très certainement par changement de la structure protéique. En particulier, nous suggérons que le site de fixation du substrat Arg soit stabilisé par un réseau de liaisons hydrogène créé par H_4B , et non par H_2B . Ainsi les études de réactivité des NOSs menées en conditions saturantes de H_2B ne peuvent *a priori* mimer la réactivité de l'enzyme qui fixe H_4B *in vivo*.

Enfin, le potentiel redox de l'espèce $\text{iNOSoxy} + \text{H}_4\text{B}$ est apparu constant sur la gamme de pH testée, autour de -518 mV (*vs* $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ 3 M). Cette valeur est inférieure de -15 mV à celle déterminée par A. Presta [75]. Dès lors, la constante de dissociation apparente du co-facteur H_4B pour la forme réduite de l'hème a été recalculée à 0,14 μM , ce qui est presque deux fois supérieur à la valeur précédemment déterminée par cette équipe. De plus l'indépendance du potentiel redox par rapport au pH suggère que la molécule d'eau portée par l'enzyme native soit chassée du site actif par la seule fixation du co-facteur. Nous concluons alors que quel que soit l'état de spin du complexe Fe^{III} de $\text{iNOSoxy} + \text{H}_4\text{B}$, il doit être 5-coordonné. Ce résultat est en particulier valable pour l'espèce Fe^{III} BS de $\text{iNOSoxy} + \text{H}_4\text{B}$ précédemment observée par spectroscopie RPE (voir chapitre III, partie 1, 3.3.1.).

Le prochain enjeu sera la détermination directe du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ de iNOSoxy . Cette étude pourra être menée en solution à condition de trouver un médiateur inerte au NO et dont le potentiel redox se trouve à proximité de celui du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$. La synthèse d'un complexe inorganique pourrait être envisagée, l'osmium semblant être un métal de choix pour atteindre la gamme de potentiels adéquate. Une alternative à la recherche d'un médiateur consisterait à greffer iNOSoxy , de manière non dénaturante, à la surface d'une électrode et de mesurer le potentiel du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ par transfert direct des électrons à l'hème. La mesure électrochimique du potentiel serait alors couplée à une technique spectroscopique permettant de certifier du maintien de la structure protéique après greffage de l'enzyme à la surface de l'électrode. Le Dr Véronique Balland poursuit

actuellement ce projet de recherche, en couplant électrochimie et spectroscopie Raman exaltée de surface.

La compréhension du mécanisme d'oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$, et par analogie du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$, des protéines à centre hémothiolate, réside encore aujourd'hui dans l'identification des paramètres physicochimiques régissant leur réactivité. Des études récentes sur le cytochrome P450_{BM3} ont suggéré une régulation de l'activité de ces hémoprotéines par le ligand thiolate proximal. En effet, sur la base de travaux de mutagenèse dirigée, Ost *et al* ont proposé que plus la capacité du ligand thiolate à donner des électrons au fer est forte, plus le potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de l'hème est bas, plus le transfert d'électrons du domaine réductase est rapide et donc plus l'activation du ligand diatomique (NO ou O_2) est efficace [189, 190]. L'équipe de J. P. Schelvis a alors étudié dans les mêmes conditions la force de la liaison Fe-S(Cys) par spectroscopie Raman de résonance mais n'a pas pu corrélérer ce dernier paramètre aux observations précédentes [191]. Le même type de caractérisation a été réalisé au laboratoire pour $\text{iNOSoxy} + \text{Arg}/+\text{H}_4\text{B}$ (résultats non publiés) en fonction du pH. Par spectroscopie Raman de résonance, nous avons observé une évolution en forme de cloche de la force de la liaison Fe-S(Cys) avec un pH optimal autour de 8. Parallèlement, une étude cinétique de l'oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ en fonction du pH a également mis en évidence un maximum pour la vitesse de la réaction à un pH autour de 8. Dans le cas de iNOSoxy tous ces paramètres pouvant alors être corrélés, nous pensions apporter par notre étude en spectroélectrochimie le dernier paramètre de réactivité. Or nos observations suggèrent la stabilisation du potentiel de $\text{iNOSoxy} + \text{Arg}/+\text{H}_4\text{B}$ pour les valeurs de pH supérieures à 7. Ainsi, il semble que le potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ des NOSs ne suffise pas à expliquer la régulation de la réactivité de l'hème. Nous suggérons que dans le cas de l'oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$, les interactions du ligand diatomique porté par le fer avec l'environnement distal de l'hème jouent un rôle essentiel dans le contrôle de sa réactivité. Dans la perspective d'identifier de telles interactions, nous proposons au chapitre suivant une étude par spectroscopie RPE du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy dans différentes conditions de substrats.

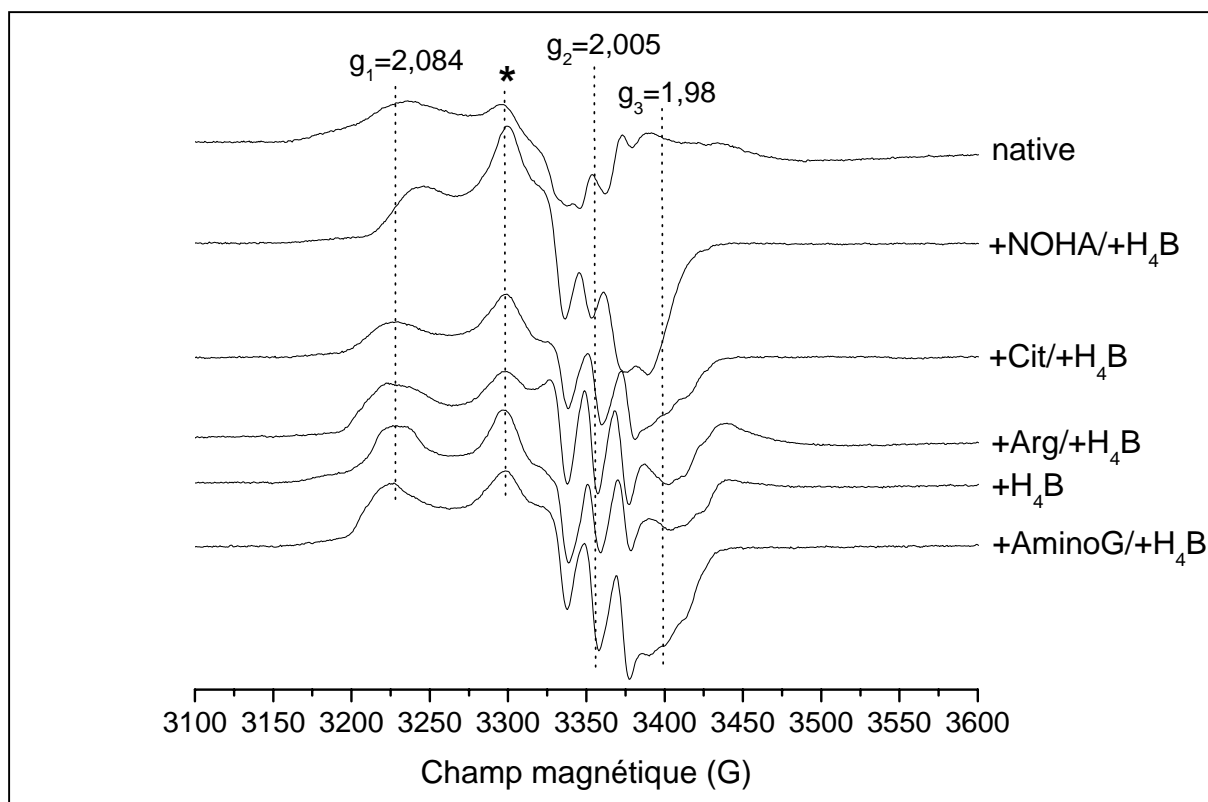


Figure IV.11. Spectres RPE des différents complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy étudiés ($\approx 80 \mu\text{M}$). Les échantillons ont été préparés en conditions strictement anaérobies, suivant le protocole développé chapitre II (1.4.), à partir de iNOSoxy Fe^{III} en absence de substrat et de co-facteur (native), en présence seule de co-facteur ($+\text{H}_4\text{B}$), et en présence de co-facteur et de différents substrats (Arginine, Arg ; Citrulline, Cit ; N^{G} -Hydroxy-arginine, NOHA ; Aminoguanidine, AminoG). Tous les spectres sont la somme de huit scans enregistrés en bande X (9,41 GHz) à 20 K, tous paramètres identiques (modulation du champ : 8 G à 100 kHz ; puissance micro-ondes : 5 mW). Les valeurs de g calculées pour la forme rhombique majoritaire (A) de l'échantillon $+\text{Cit}/+\text{H}_4\text{B}$ sont spécifiées. (*) indique la contribution de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ minoritaire à géométrie axiale (B).

$\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$	forme rhombique (A)					forme axiale (B)
	g_1	g_2	g_3	a_{g_2} (G)	a_{g_3} (G)	g_{\perp} (G)
native	2,079	2,005	n. d.	19	n. d.	2,041
$+\text{Cit}/+\text{H}_4\text{B}$	2,084	2,005	1,98	21	11,3	2,040
$+\text{H}_4\text{B}$	2,083	2,005	1,97	20	12	2,040
$+\text{Arg}/+\text{H}_4\text{B}$	2,087	2,006	1,97	19,4	12	2,040
$+\text{NOHA}/+\text{H}_4\text{B}$	2,073	2,008	1,99	18	n. d.	2,038
$+\text{AminoG}/+\text{H}_4\text{B}$	2,085	2,005	1,98	20	12	2,039

Table IV.4. Tableau rapportant les valeurs mesurées en RPE à 20 K pour les composantes du tenseur g de la forme majoritaire rhombique (A) (g_1 , g_2 , g_3) et de la forme minoritaire axiale (B) (g_{\perp}) des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy. Les constantes de couplage hyperfin en gauss (G), calculées pour les composantes g_2 (a_{g_2}) et g_3 (a_{g_3}) du tenseur de la forme rhombique (A) sont spécifiées. Ces valeurs sont issues des spectres RPE présentés figure IV.11.

2. Propriétés spectroscopiques de l'espèce $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$:

La caractérisation par RPE des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ des protéines à centre hémithiolate (cytochromes P450, NOS) a été réalisée par de nombreuses équipes. $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ était alors essentiellement étudié en tant que système modèle du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$, intermédiaire clef du cycle catalytique des cytochromes P450. Différentes études ont été menées afin d'identifier les interactions régissant la réactivité du ligand diatomique, en fonction de différents paramètres comme la présence d'un substrat et sa nature. Pour ce qui est des NOSs, seul le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de l'isoforme neuronale a été étudié par RPE. Nous proposons donc de mener cette étude pour l'isoforme inductible et de comparer nos résultats avec ceux précédemment obtenus pour l'isoforme neuronale. Enfin, ces données pour le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ des isoformes de mammifères seront comparées à celles de l'isoforme bactérienne (bsNOS), pour laquelle la structure cristallographique a récemment été publiée [89].

L'ensemble de ces résultats nous permettra de compléter notre étude de la réaction dite cytotoxique des NOSs, par une première caractérisation de l'équilibre entre les différents complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$.

2.1. Caractérisation en spectroscopie RPE classique des différents complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy :

Différents échantillons $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy ont été préparés, en conditions strictement anaérobies, pour analyse en spectroscopie RPE. Les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ sont très fragiles et un soin particulier a été apporté à la préparation des échantillons pour éviter que des excès de dithionite ou de NO ne les déstabilisent (voir chapitre II, 1.4.).

La figure IV.11 présente les spectres RPE, enregistrés à 20 K, des différents complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy étudiés. Ils sont très similaires à ceux précédemment obtenus par C. T. Migita pour l'isoforme neuronale de NOS [192], et plus généralement à ceux des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ des protéines à centre hémithiolate [193, 194]. Ainsi, conformément aux données de la littérature pour les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de cytochromes P450 et de globines, deux formes spectrales différentes semblent co-exister sur chaque enregistrement. L'espèce majoritaire (A) présente les caractéristiques d'une géométrie rhombique, avec trois composantes distinctes pour le tenseur g observées autour de 2,08-2,005-1,98. Chaque pic présente une structure hyperfine en triplet due au couplage entre le spin électronique ($S = \frac{1}{2}$) et le spin nucléaire de

$\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$	rhombique (A)					axiale (B)	Référence
	g_1	g_2	g_3	a_{g_2} (mT)	a_{g_3} (mT)	g_{\perp}	
nNOS	2,080	2,005	1,97	2,03	1,17	2,03	[192]
nNOS +Arg	2,086	2,005	1,97	2,08	1,17	-	[192]
nNOS +NOHA	2,077	2,021	1,99	1,94	1,09	n. d.	[192]
nNOS +NMA	2,07	2,021	1,99	2,18	1,38	n. d.	[192]
nNOS « P420 »	-	2,009	-	1,66	-	n. d.	[192]
nNOS W409Y « P420 »	2,114	2,028	2,015	2,05	1,66	n. d.	[195]
eNOS	-	-	-	-	-	2,035	[196]
P450 _{CAM}	2,073	2,009	1,976	1,92	n. d.	-	[193]
P450 _{CAM} « P420 »	2,072	2,015	2,072	1,60	-	-	[193]
P450 _{SCC}	2,071	2,001	1,962	2,20	1,96	2,034	[194]
P450 _{SCC} « P420 »	-	2,007	-	1,67	-	-	[194]
HRP	2,076	2,008	1,967	2,08	0,6	-	[193]
Cyt c Peroxidase	2,08	2,004	1,96	2,10	0,6	-	[197]
Chloroperoxidase	2,082	2,004	1,975	2,00	-	-	[198]
Catalase	2,05	2,003	1,97	2,20	0,73	2,03	[197]

Table IV.5. Tableau rapportant les valeurs mesurées en RPE pour les trois composantes du tenseur g de l'espèce rhombique (A) (g_1 , g_2 , g_3) ainsi que les constantes de couplage hyperfin (mT), mesurées pour g_2 (a_{g_2}) et g_3 (a_{g_3}) sur différents complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ d'hémoprotéines. Dans certains cas l'espèce axiale (B) a été observée et la valeur g_{\perp} de son tenseur a été reportée.

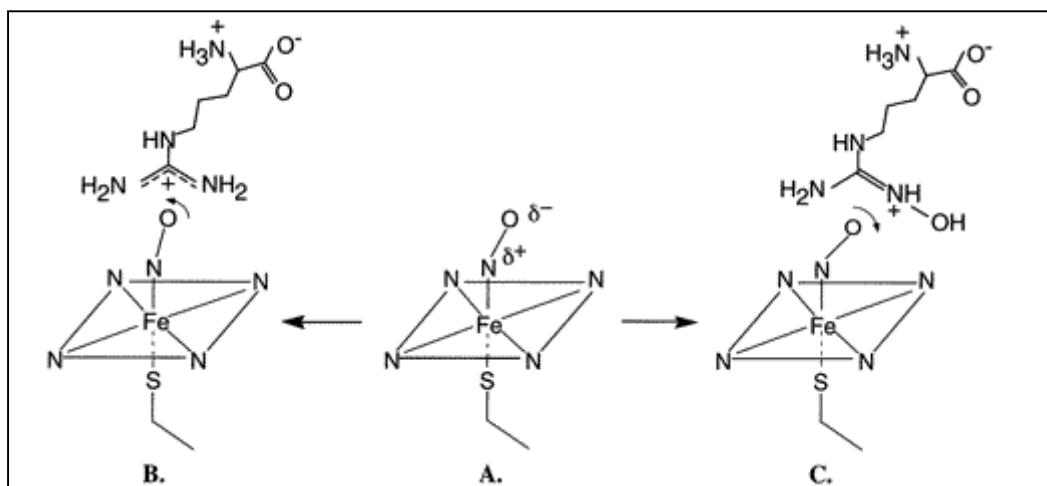


Figure IV.12. Représentation schématique de la géométrie qui pourrait être adoptée par le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ rhombique de nNOS native (A.), et en présence du substrat Arg (B.) ou NOHA (C.). Issue de l'article de C. T. Migita [192].

l'azote du NO (^{14}N , $I = 1$). Ce couplage est essentiellement observé pour la composante en g_2 . D'après les données de la littérature, l'espèce minoritaire (B) présenterait les caractéristiques d'un complexe à géométrie axiale. La composante perpendiculaire à l'hème du tenseur g , g_{\perp} , est observée autour de 2,04. Sa composante parallèle à l'hème, g_{\parallel} , n'est pas observée, soit parce que la contribution de la forme axiale dans le spectre est trop faible, soit parce que g_{\parallel} se confond dans les composantes g_2 et g_3 de la forme rhombique (A). Les valeurs des composantes du tenseur g pour les deux espèces et du couplage hyperfin associé à la forme rhombique sont reportées table IV.4. Pour comparaison, la table IV.5 indique les valeurs obtenues pour d'autres complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ d'hémoprotéines.

Les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ sont stabilisés par la présence du co-facteur H_4B et/ou d'un substrat dans la poche distale de l'hème. De fait, les spectres RPE, et notamment les couplages hyperfins pour la forme rhombique majoritaire (A), sont mieux résolus en leur présence que lors de l'étude de iNOSoxy native. Ce résultat suggère une interaction du substrat avec le ligand NO, qui aurait pour effet de restreindre ses possibles orientations dans la poche distale de l'hème. De plus, il semble que la nature du substrat affecte l'anisotropie du signal de la forme rhombique (A) qui augmente suivant l'ordre : +NOHA/+ H_4B , + H_4B , +Cit/+ H_4B , +AminoG/+ H_4B , +Arg/+ H_4B (fig. IV.11, table IV.4). C. T. Migita a observé le même phénomène lors de l'étude des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de l'isoforme neuronale [192], et en particulier entre les deux complexes extrêmes formés en présence de NOHA et Arg, respectivement substrats de la deuxième et première étape du cycle catalytique des NOSs. La charge portée par le groupe guanidinium de NOHA est localisée alors qu'elle ne l'est pas dans le cas de l'arginine. Ainsi les auteurs ont proposé qu'en présence de NOHA, l'angle formé par Fe-N-O soit plus coudé que dans le cas de l'arginine (fig. IV.12). Cette conclusion est en accord avec la mesure de l'angle Fe-N-O récemment déterminé par cristallographie pour les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de l'isoforme bactérienne en présence de Arg (132°) et NOHA (126°) [89].

2.2. Etude des différentes géométries du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ des NOSs :

De nombreux travaux rapportent la complexité de l'étude des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ par RPE, et leur importance pour la compréhension de la coordination d'un ligand diatomique au fer (NO ou O_2) en conditions physiologiques. Les études menées sur les globines semblent converger vers un modèle simple initialement proposé par R. H. Morse et S. I. Chan où deux formes, l'une de géométrie rhombique, l'autre de géométrie axiale, co-existeraient dans les spectres

RPE [199]. Cette hypothèse a été validée par des études en spectroscopie RPE à impulsions (ENDOR, HYSCORE) de différents complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ [200, 201] qui démontrent que l'équilibre entre ces deux géométries dépend drastiquement de l'environnement de l'hème.

Tout d'abord, les deux formes du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ se différencieraient par des paramètres de saturation différents en fonction de la puissance des micro-ondes [202]. Ensuite, il semble admis que la contribution de chaque forme dans le signal RPE dépend de la température, la forme rhombique étant majoritaire à basse température, et la forme axiale à haute température. Cependant la complexité du système n'ayant jamais permis l'obtention expérimentale des spectres purs de chaque complexe, deux modèles ont été proposés pour simuler l'évolution des spectres RPE en fonction de la température. Le premier modèle repose sur un équilibre thermique entre les deux formes rhombique et axiale, sans modification de l'anisotropie des signaux avec la température [199, 203]. Ainsi, chaque spectre RPE pourrait être simulé par la somme des spectres purs de chacune des deux formes, avec des contributions différentes en fonction de la température. Le second modèle ajoute au premier une variation significative de l'anisotropie du signal des formes rhombique et axiale avec la température, qui diminuerait et augmenterait respectivement, et propose ainsi l'existence d'un panel de conformations permises pour le ligand diatomique dans les deux géométries [204].

Aucune des études menées jusqu'à présent sur les NOSs, et à notre connaissance sur les protéines à centre hémithiolate, ne discute la co-existence et l'équilibre de différentes géométries pour le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ hexacoordiné, et seule la forme rhombique majoritaire (A), observée à basse température, a jusqu'ici été décrite. Nous proposons donc ici une première caractérisation des différentes géométries adoptées par le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy + Arg/+H₄B.

Dans un premier temps, nous avons déterminé les paramètres de saturation des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ formés par iNOSoxy + Arg/+H₄B à basse température (4 K), ce qui nous a permis de proposer la co-existence de trois espèces. Dans un second temps, et toujours sur la base des travaux réalisés sur les globines, nous avons étudié l'évolution des spectres RPE en fonction de la température afin de comprendre quel type de modèle pouvait rendre compte de l'évolution de chacune des trois espèces. La même étude a ensuite été menée dans différentes conditions de substrat pour observer l'influence de l'environnement de l'hème. Enfin, ces résultats ont été comparés à ceux obtenus pour les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de l'isoforme bactérienne bsNOS, pour lequel nous avons précédemment mis en évidence des différences de réactivité, très certainement liées à l'environnement distal de l'hème (voir partie 1, 4.). Toutes ces expériences ont été menées sur des échantillons $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ concentrés à environ 1 mM.

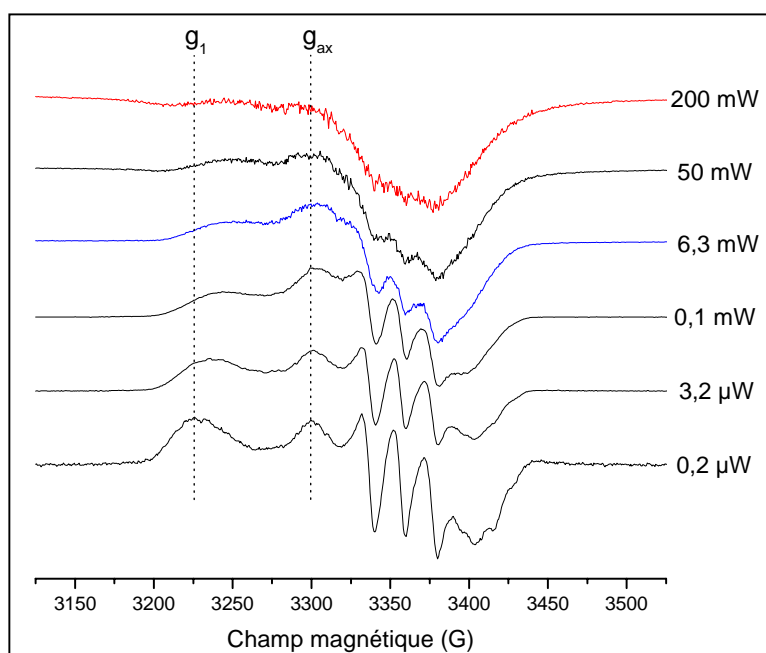


Figure IV.13. Etude en saturation de l'échantillon $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy +Arg/+H₄B à 4 K. La puissance varie de 0,2 μW à 200 mW, tous les autres paramètres étant égaux. Les valeurs de g retenues pour suivre l'évolution de l'amplitude du signal en fonction de la puissance pour les formes dites rhombique (g_1) et axiale (g_{ax}) sont indiquées.

2.2.1. Etude de la saturation des différents complexes Fe^{II}-NO de iNOSoxy +Arg/+H₄B : mise en évidence d'une troisième géométrie.

La figure IV.13 présente les spectres RPE enregistrés à 4 K pour un échantillon Fe^{II}-NO +Arg/+H₄B de iNOSoxy, à différentes valeurs de puissance des micro-ondes. A basse puissance (0,2 μW), la forme rhombique (A) prédomine dans le signal RPE. Alors que la puissance augmente, ce signal rhombique sature et nous observons la diminution de son amplitude jusqu'à sa totale disparition. Il en est de même pour la forme dite axiale (B), précédemment décrite (2.1.). Cependant, d'après les données de la littérature, les formes rhombique et axiale devraient avoir des paramètres de saturation différents (voir ci-dessus). Ainsi nous avons cherché à déterminer les paramètres de saturation de chaque espèce, afin de pouvoir extraire du spectre RPE enregistré à faible puissance les spectres purs de ces deux formes. Pour cela nous avons procédé comme suit.

2.2.1.1. Hypothèses :

Notre première hypothèse a été de considérer que le spectre RPE de chaque espèce sature de la même façon en chaque point du spectre.

Notre seconde hypothèse a été de considérer que deux espèces (1) et (2) composent le spectre RPE enregistré à toutes les puissances micro-onde (P). Ainsi, à chaque valeur de champ, l'amplitude A(P) du signal s'écrit :

$$A(P) = A_1(P) + A_2(P)$$

avec A₁(P) et A₂(P) les amplitudes respectives du signal de la forme (1) et de la forme (2).

2.2.1.2. Détermination des paramètres de saturation de la forme (1) :

En g₁ = 2,087, la contribution de la forme (2) dans le spectre est négligeable, et nous pouvons écrire : A(P) ≈ A₁(P). Ainsi les paramètres de saturation de la forme (1) ont été obtenus par modélisation, en g₁, de l'évolution de l'amplitude A en fonction de la puissance, suivant l'équation :

$$A(P) = K_1 \times \frac{\sqrt{P}}{\left(1 + \frac{P}{P_{1/2,1}}\right)^{\frac{b_1}{2}}}$$

avec P_{1/2,1} la puissance de saturation de la forme (1) et b₁ le paramètre d'inhomogénéité qui lui est associé. K₁ représente alors l'amplitude du signal RPE de la forme (1) en g₁, affectée

Forme $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$	Paramètres de saturation	iNOSoxy +Arg/+H ₄ B
Forme (1)	b_1	1,10
	$P_{1/2,1}$	5,4 μW
Forme (2)	b_2	1
	$P_{1/2,2}$	217,5 μW

Table IV.6. Paramètres de saturation calculés pour les formes (1) et (2) du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy +Arg/+H₄B. Soient b_1 et b_2 le facteur d'inhomogénéité, et $P_{1/2,1}$ et $P_{1/2,2}$ la puissance de saturation des formes (1) et (2), respectivement. Dans un premier temps les paramètres de saturation de la forme (1) ont été obtenus par modélisation de l'évolution de l'amplitude du signal RPE en g_1 en fonction de la puissance, en considérant que le signal de la forme (2) n'intervient pas à cette valeur de g .

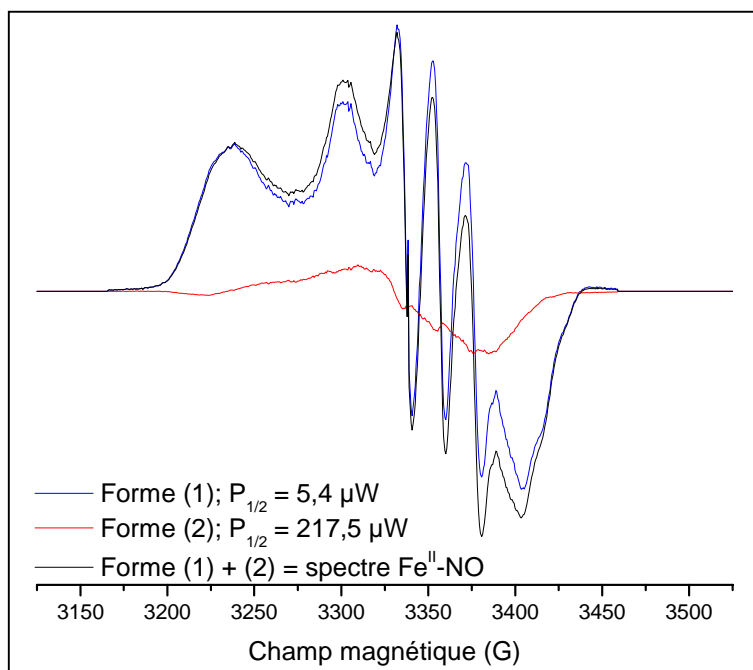


Figure IV.14. Superposition des spectres RPE théoriques des formes (1) et (2) à 4 K (spectres bleu et rouge), obtenus par décomposition du spectre RPE de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ +Arg/+H₄B de iNOSoxy à basse puissance (spectre noir). La forme (1) sature à 5,4 μW et la forme (2) à 217,5 μW . Ainsi la forme (1) correspondrait à la somme des spectres RPE des espèces rhombique (A) et axiale (B). La forme (3) représenterait le spectre d'une troisième espèce rhombique (C).

d'un coefficient de normalisation. Cette modélisation a été réalisée sur l'intégrale de la résonance en g_1 afin d'améliorer le rapport signal sur bruit.

La modélisation des données expérimentales est présentée annexe (4.2.) et indique que la forme (1) sature avec un $P_{1/2,1}$ de 5,4 μ W (table IV.6).

2.2.1.3. Détermination des paramètres de saturation de la forme (2) :

Aux autres valeurs de champ ($g < g_1$), et en particulier en g_{ax} (fig. IV.13), les deux formes spectrales contribuent au signal enregistré. Ainsi, l'évolution de l'amplitude A en fonction de la puissance micro-onde doit suivre la relation :

$$A(P) = K_1 \times \frac{\sqrt{P}}{\left(1 + \frac{P}{P_{1/2,1}}\right)^{\frac{b_1}{2}}} + K_2 \times \frac{\sqrt{P}}{\left(1 + \frac{P}{P_{1/2,2}}\right)^{\frac{b_2}{2}}}$$

avec $P_{1/2,1}$ et b_1 les paramètres de saturation de la forme (1) précédemment déterminés (table IV.6). Alors les variables de l'équation sont d'une part $P_{1/2,2}$ et b_2 , paramètres de saturation de la forme (2), et d'autre part K_1 et K_2 , qui représentent l'amplitude du signal RPE des formes (1) et (2), affectées d'un coefficient de normalisation. Pour minimiser le rapport signal sur bruit, cette modélisation a été effectuée sur l'intégrale du spectre RPE en g_{ax} .

La modélisation des données expérimentales, présentée annexe (4.2.), indique que la forme (2) sature avec un $P_{1/2,2}$ de 217,5 μ W (table IV.6).

2.2.1.4. Décomposition du spectre RPE de Fe^{II}-NO :

Une fois les paramètres de saturations des formes (1) et (2) déterminés (table IV.6), nous avons utilisé la formule de calcul de l'amplitude pour obtenir les valeurs de K_1 et K_2 à chaque valeur de champ. Pour ce faire les paramètres $P_{1/2,1}$, b_1 , $P_{1/2,2}$ et b_2 ont été définis comme des constantes, les seules variables de l'équation étant K_1 et K_2 . Les valeurs K_1 et K_2 ont ensuite été ajustées, à chaque valeur du champ, de manière à correspondre aux données expérimentales, ce qui nous a permis d'obtenir les spectres RPE des formes (1) et (2). Notons qu'à partir d'un programme de calcul pouvant intégrer toutes les variables de l'équation et d'un plus grand nombre d'enregistrements (incrémentations plus petite de la puissance) les spectres des formes (1) et (2) auraient pu être obtenus directement.

La figure IV.14 présente les spectres des formes (1) et (2), correspondant aux paramètres de saturation de la table IV.6, et qui composent le spectre RPE de Fe^{II}-NO enregistré à basse puissance entre 3019 et 3619 G. Le signal de la forme (1), qui sature à 5,4 μ W, correspondrait

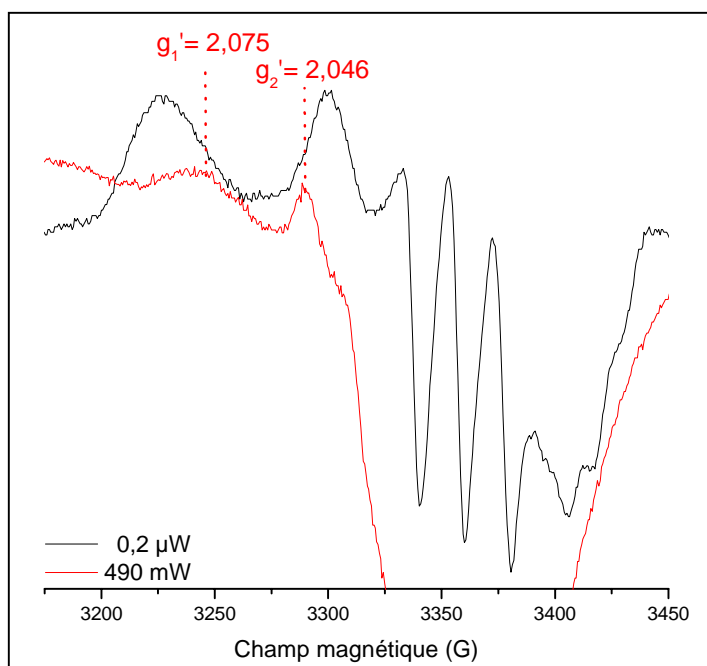


Figure IV.15. Superposition des spectres RPE $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy +Arg/+H₄B enregistrés en bande X à 10 K, à 0,2 μW (spectre noir) et 490 mW (spectre rouge).

aux deux espèces rhombique (A) et axiale (B) précédemment décrites (voir 2.1.). Le signal de la forme (2), qui sature à $217,5 \mu\text{W}$, correspondrait à un troisième complexe (C), inattendu, de géométrie rhombique. Ainsi, ce modèle semble remettre en cause l'attribution faite jusqu'à présent en suggérant la co-existence de trois espèces à basse température pour le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} + \text{Arg}/+\text{H}_4\text{B}$ de iNOSoxy.

Pour confirmer cette hypothèse, un spectre RPE a été enregistré à plus forte puissance (490 mW), ce qui devrait assurer la saturation totale du signal des deux espèces (A) et (B) composant la forme (1), et peut être permettre l'observation du spectre de la forme (2), soit de la troisième espèce (C). La figure IV.15 présente les spectres RPE enregistrés à 10 K pour l'échantillon $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} + \text{Arg}/+\text{H}_4\text{B}$ de iNOSoxy à 490 mW (spectre rouge) et $0,2 \mu\text{W}$ (spectre noir), tous les autres paramètres étant égaux pour comparaison. Le signal RPE de la troisième espèce rhombique (C) apparaît sans ambiguïté. Il présente les caractéristiques d'une géométrie rhombique avec trois composantes du tenseur : $g_1 = 2,075$, $g_2 = 2,046$, g_3 n'étant pas résolue du fait de la déformation du spectre à si forte puissance. Par ailleurs, la présence d'épaulements à $2,075$ et $2,046$ sur le spectre RPE enregistré à $0,2 \mu\text{W}$ (fig. IV.15, spectre noir) témoigne de la contribution de l'espèce (C) dans le signal.

Ainsi l'étude de la saturation du signal RPE nous permet de proposer l'existence de trois géométries pour le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} + \text{Arg}/+\text{H}_4\text{B}$ de iNOSoxy. Deux formes rhombiques, (A) et (C), et une forme (B) supposée axiale d'après les données de la littérature. La question qui se pose à présent est de savoir quelle(s) relation(s) lie(nt) ces trois formes spectrales. Pour cela nous avons étudié l'évolution du spectre RPE de cet échantillon en fonction de la température.

2.2.2. Etude de l'évolution du spectre RPE des différents complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy +Arg/+H₄B en fonction de la température :

Deux relations très différentes ont été proposées pour rendre compte de l'évolution des spectres RPE des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ des globines avec la température (voir introduction 3.2.). Leur point commun est de considérer la co-existence de deux espèces dans chaque spectre : une forme rhombique (R) et une forme axiale (A).

D'après R. H. Morse et S. I. Chan, les complexes (R) et (A) seraient en équilibre thermique, au sens RPE du terme. La forme rhombique (R) serait majoritaire à basse température et se transformerait en la forme axiale (A) à mesure que la température augmente. Ainsi chaque spectre RPE pourrait être calculé à partir d'une combinaison des spectres purs de ces deux

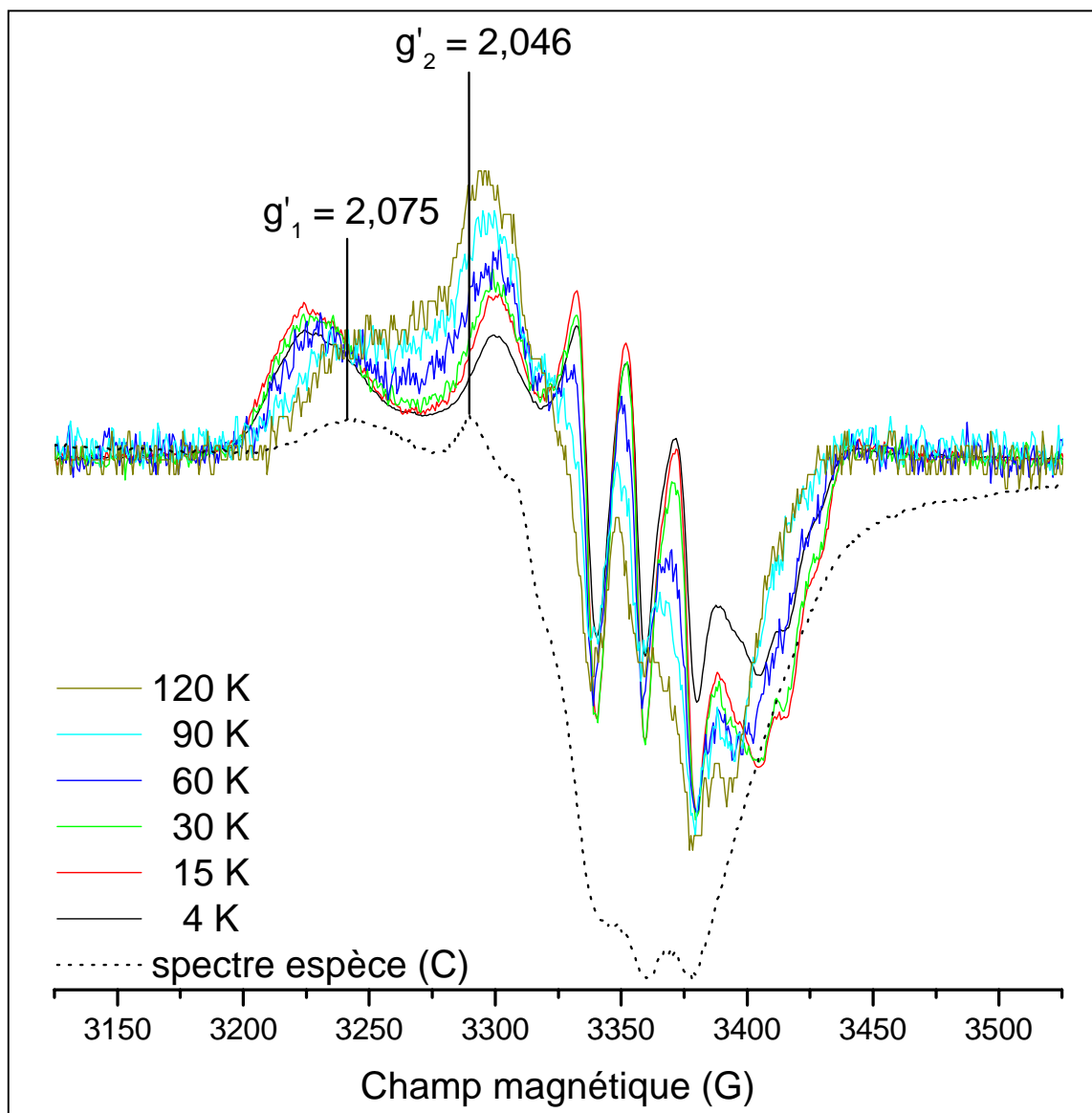


Figure IV.16. Superposition des spectres RPE enregistrés en bande X (9,42 GHz) pour le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy + Arg/+H₄B (≈ 1 mM) à différentes températures (4 - 15 - 30 - 60 - 90 - 120 K), tous les autres paramètres étant égaux (puissance : 0,2 μW). Chaque spectre a été multiplié par la température à laquelle il a été enregistré pour comparaison. Le spectre RPE en pointillés a été enregistré à 10 K à 194 mW et représente l'espèce (C) ; les valeurs de son tenseur sont spécifiées sur la figure.

espèces, chacune ayant une géométrie donnée, distincte de l'autre, et non dépendante de la température : seule la proportion de chaque espèce dans le signal RPE évoluerait.

D'après l'équipe de G. Bemski, la géométrie de chaque complexe, (R) et (A), en plus de leur proportions relatives, changerait avec la température. Ainsi l'anisotropie et l'amplitude du signal de l'espèce rhombique (R) diminueraient avec la température alors qu'*a contrario*, l'anisotropie et l'amplitude du signal de l'espèce axiale (B) augmenteraient.

La figure IV.16 présente la superposition des spectres RPE de l'échantillon $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} + \text{Arg}/+\text{H}_4\text{B}$ de iNOSoxy, enregistrés à différentes températures comprises entre 4 et 120 K. Puisque la contribution, et l'observation, du signal des espèces (A), (B) et (C) dépendent de la puissance (voir 2.2.1.), les spectres ont été enregistrés à la même puissance, non saturante, quelle que soit la température (0,2 μW). Alors que la température augmente, le signal RPE s'affine. Ainsi, comme dans le cas des globines, le spectre RPE des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de NOS dépend de la température.

Nous avons précédemment démontré que trois formes spectrales composent nos enregistrements (voir 3.2.1.) : deux formes rhombiques (A) et (C), et une forme (B) probablement axiale. A partir de ce résultat et des spectres obtenus lors de l'étude en saturation (voir 3.2.1.4.), il semble que tous les enregistrements, quelle que soit la température, puissent être simulés par une combinaison des spectres RPE des deux formes rhombiques (A) et (C), sans variation de l'anisotropie des signaux, c'est-à-dire sans variation de la géométrie de ces deux espèces (simulations non présentées). Seules leurs proportions relatives évolueraient avec la température. Dans ces conditions, le signal de l'espèce (B) évoluerait peu voire pas avec la température, tant en termes de valeurs de g que d'amplitude.

Ainsi nous proposons que l'évolution du spectre RPE avec la température rende compte d'un équilibre thermique entre les deux formes rhombiques (A) et (C) du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} + \text{Arg}/+\text{H}_4\text{B}$ de iNOSoxy, et non entre une forme rhombique et une forme axiale comme dans le cas des globines.

Ces résultats suggèrent qu'à température physiologique, le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} + \text{Arg}/+\text{H}_4\text{B}$ de iNOSoxy existe quasi-exclusivement suivant la géométrie de l'espèce (C). Cette hypothèse est en accord avec le spectre RPE enregistré à plus haute température (230 K) présenté figure IV.17-A (spectre bleu). Ainsi, la géométrie de l'espèce (A), la plus anisotrope, serait adoptée par le complexe sous l'effet d'une contrainte à basse température. Quant à l'espèce (B), supposée de géométrie axiale, il semble que sa contribution dans le spectre RPE n'évolue pas avec la température.

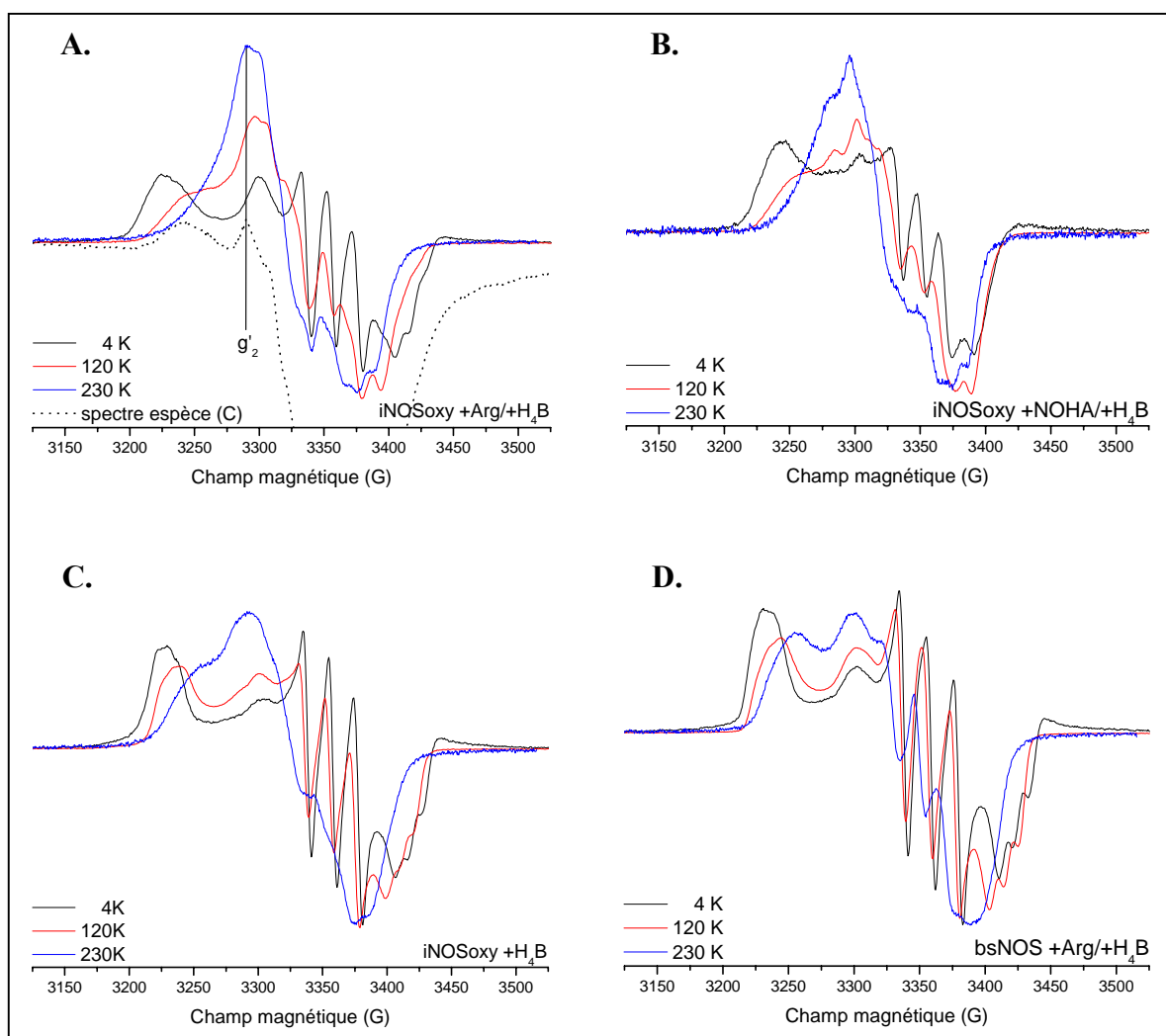


Figure IV.17. Superposition des spectres RPE de complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de NOSs enregistés en bande X dans différentes conditions de substrat et de co-facteur, à différentes températures : 4 K 0,2 μW (noir), 120 K 2 mW (rouge) et 230 K 125 μW (bleu). A chaque température les spectres ont été enregistrés à une puissance différente, non saturante. Tous les spectres ont été normalisés à la même aire du signal d'absorption (intégrale du spectre RPE) pour comparaison. **A.** iNOSoxy + Arg/ H_4B ; le spectre RPE en pointillés a été enregistré à 10 K à 194 mW et représente l'espèce (C). **B.** iNOSoxy + NOHA/ H_4B . **C.** iNOSoxy + H_4B . **D.** bsNOS + Arg/ H_4B .

2.2.3. Influence de l'environnement de l'hème :

La même étude a été réalisée pour le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy dans différentes conditions d'environnement de l'hème, et pour l'isoforme bactérienne en présence de Arg et H_4B . L'étude de tous ces échantillons à basse température en fonction de la puissance a mis en évidence deux populations avec des paramètres de saturation similaires à ceux obtenus pour le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy +Arg/+ H_4B (formes (1) et (2) saturant autour de 5 et 200 μW). Ainsi nous proposons que les espèces (A), (B) et (C) puissent probablement exister pour tous les échantillons $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de NOS testés.

La figure IV.17 (A-B-C) présente la superposition des spectres RPE enregistrés à 4 - 120 et 230 K pour différents échantillons $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy. En conditions saturantes de NOHA et H_4B , l'évolution du spectre RPE du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ en fonction de la température présente un comportement très similaire de celui de l'échantillon +Arg/+ H_4B . Une espèce (A), majoritaire à basse température, serait en équilibre thermique avec une espèce (C) moins anisotrope et dont le signal rhombique serait majoritaire à haute température. Il est intéressant d'observer qu'en absence de substrat, l'équilibre entre les espèces (A) et (C) semble déplacé vers des températures plus élevées (fig. IV.17-C). Ainsi, nous suggérons une interaction du substrat avec le ligand diatomique NO, qui aurait pour effet de favoriser une géométrie moins coudée du complexe au site actif. De plus, la comparaison des spectres enregistrés à 120 K (fig. IV.17-A et B, spectre rouge) semble indiquer que le substrat Arg induise cette transition à plus basse température que NOHA, ce qui pourrait être justifié par la proposition de localisation de charge faite par C. T. Migita [192] et illustrée figure IV.12.

Ainsi, il semble évident que l'environnement de l'hème contrôle l'équilibre entre les différentes géométries que peut adopter le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ au site actif de iNOSoxy, comme l'a démontré J. Hüttermann par spectroscopie RPE à impulsions pour l'hémoglobine [200, 201].

La figure IV.17-D, qui présente l'évolution du spectre RPE du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ au site actif de l'isoforme bactérienne, renforce ce résultat. En effet, en présence de Arg et H_4B , l'équilibre thermique entre les formes (A) et (C) semble être déplacé vers des températures plus élevées, ce qui rappelle le comportement observé pour l'échantillon $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ + H_4B (fig. IV.17-C). Ainsi, dans le cas de bsNOS le substrat n'aurait pas le même effet sur le ligand diatomique à haute température que dans le cas de iNOSoxy. Une différence majeure, entre les isoformes inductible et bactérienne, est la substitution du résidu valine 214 par une isoleucine au site actif de bsNOS. Ces résidus ne peuvent interagir directement avec NO, cependant le groupe méthyl supplémentaire de l'isoleucine est suffisamment proche pour

pouvoir exercer une contrainte stérique sur le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ (3,5 - 3,8 Å) [89] ou encore influencer le positionnement du substrat Arg dans la poche de l'hème. Ainsi, nous proposons que l'isoleucine de bsNOS puisse contraindre le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ dans une configuration plus coudée.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence de trois géométries pour le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ des NOSs : deux formes rhombiques (A et C) et une forme probablement axiale (B). Si la forme (B) semble ne pas évoluer avec la température, nous proposons que les formes (A) et (C) s'échangent suivant un modèle d'équilibre thermique. La forme (A) serait majoritaire à basse température alors qu'il semble que la forme (C) soit plus représentative de la géométrie du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ à température physiologique. Il est important ici de souligner que la seule comparaison des données de la littérature sur les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ des NOSs et des globines, suggérerait un équilibre entre les formes (A) et (B).

Par ailleurs, l'équilibre entre les deux formes (A) et (C) semble contrôlé par l'environnement de l'hème, ce qui renforce l'hypothèse suivant laquelle les interactions entre le ligand diatomique NO et l'environnement distal de l'hème puissent contrôler la réactivité du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ des NOSs.

La structure cristallographique du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de bsNOS, récemment publiée par K. Pant [89], suggère que le ligand diatomique NO soit engagé dans un réseau de liaisons hydrogène avec le substrat Arg et une molécule d'eau. De plus, ces interactions seraient différentes suivant la nature du substrat (Arg ou NOHA), ainsi les auteurs ont proposé qu'elles puissent régir la réactivité des complexes diatomiques de Fe^{II} des NOSs ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ et par analogie $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$). La spectroscopie RPE à impulsions est une technique de choix pour observer des couplages entre un spin électronique et les spins nucléaires de noyaux tels que des atomes d'hydrogène. Ainsi, nous avons réalisé une étude préliminaire des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy par spectroscopie RPE à impulsions (ESEEM et ENDOR), pour tenter de mettre en évidence de telles interactions.

2.3. Caractérisation par spectroscopie RPE à impulsions des interactions formées par le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ dans la poche de l'hème :

Si une interaction de type liaison hydrogène intervient dans la stabilisation des espèces (A) et (C) au site actif des NOSs, elle devrait se traduire par un couplage du spin électronique avec

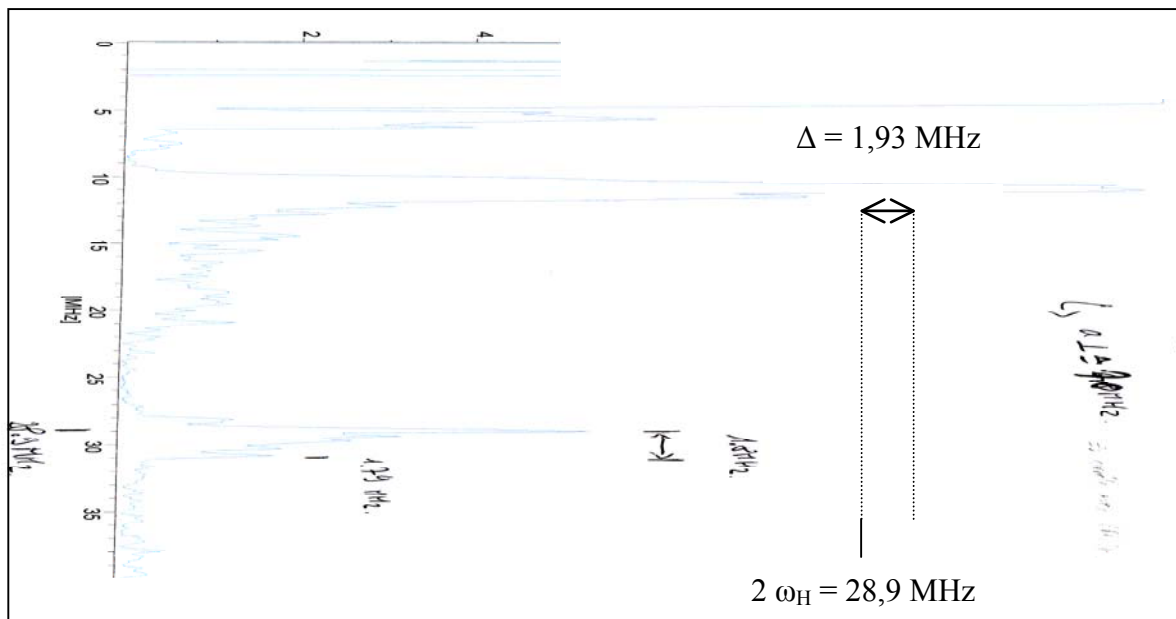


Figure IV.18. Spectre ESEEM à quatre impulsions enregistrés sur l'échantillon $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} + \text{Arg}/\text{H}_4\text{B}$ de iNOSoxy en bande X (9,62 GHz) à 3408 G (maximum observé pour le spectre deux impulsions de séquence $\pi/2 - \tau - \pi - 2\tau$, avec $\tau = 136$ ns). La séquence à quatre impulsions de l'expérience présentée est : $\pi/2 - \tau - \pi/2 - t_1 - \pi - t_1 - \pi/2 - \tau$, avec $\tau = 136$ ns, et $t_1 = 64$ ns. La durée des impulsions $\pi/2$ est de 12 ns, celle des impulsions π de 24 ns.

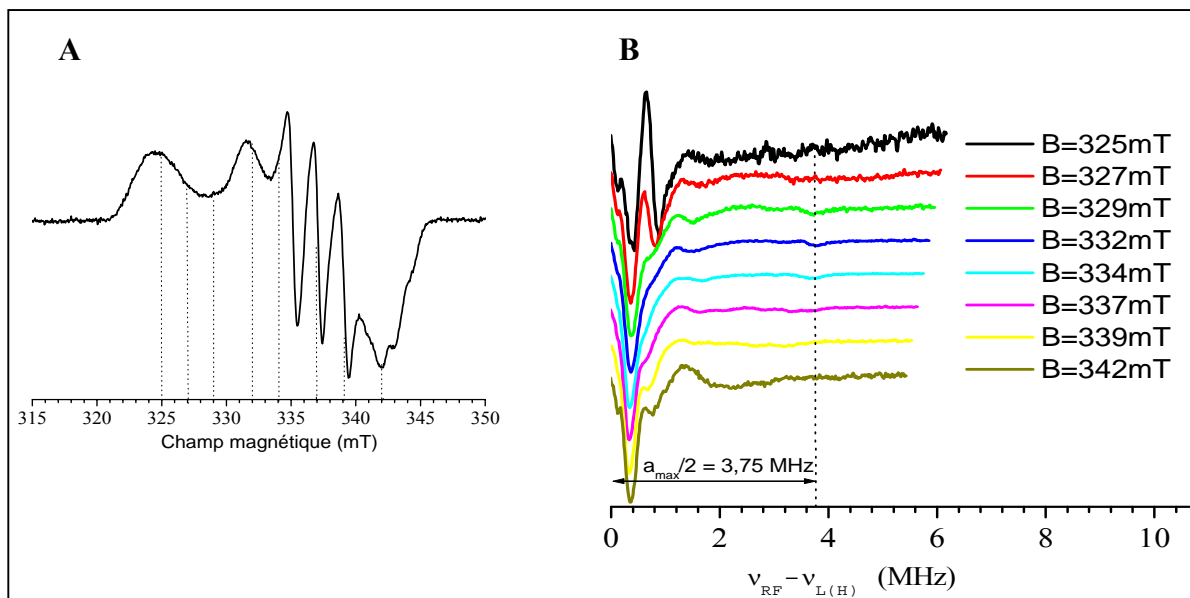


Figure IV.19. A. Spectre RPE de l'échantillon $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} + \text{Arg}/\text{H}_4\text{B}$ de iNOSoxy enregistré en bande X (9,47 GHz) dans la cavité du spectromètre ENDOR. Le champ magnétique est exprimé en mT, et les traits en pointillés indiquent les valeurs de champ auxquelles ont été enregistrés les spectres ENDOR. B. Spectres ENDOR enregistrés pour l'échantillon $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} + \text{Arg}/\text{H}_4\text{B}$ de iNOSoxy à différentes valeurs de champ magnétique (mT). La fréquence de Larmor du proton ($\nu_{\text{L(H)}}$) a été soustraite aux radiofréquences (ν_{RF}) mesurées pour mettre en évidence les couplages du spin électronique avec des noyaux ^1H .

le spin nucléaire d'un proton et être observée par spectroscopie RPE à impulsions. Ainsi, une étude très préliminaire des échantillons Fe^{II}-NO +Arg/+H₄B et Fe^{II}-NO +NOHA/+H₄B de iNOSoxy a été menée par spectroscopies ESEEM et ENDOR. Ces techniques requièrent une analyse des échantillons à basse température (4 K), ce qui rend l'expérience difficile du fait de la présence dans ces conditions des trois géométries (A), (B) et (C) du complexe Fe^{II}-NO. Ainsi les mesures ont été réalisées à différentes valeurs de champ, en privilégiant dans un premier temps la valeur en g₁ de l'espèce (A) puisque c'est *a priori* le seul point où une seule espèce contribue au spectre.

La figure IV.18 présente le meilleur spectre ESEEM à quatre impulsions enregistré pour l'échantillon Fe^{II}-NO +Arg/+H₄B de iNOSoxy, mettant en évidence un couplage du spin électronique avec un proton. Avec cette séquence à quatre impulsions, le pic du proton libre est observé à 28,9 MHz, ce qui correspond à deux fois sa fréquence de Larmor ($\omega_H = 14,45$ MHz pour B = 3408 G). Le pic associé au proton couplé au spin électronique, avec une constante de couplage (a), doit être séparé du pic du proton libre par un écartement Δ qui vérifie la relation :

$$\Delta = \frac{9 \times a^2}{16 \times \omega_H} \quad .$$

Ainsi la constante du couplage a été déterminée à ≈ 7 MHz, ce qui est compatible avec une interaction de type liaison hydrogène [205]. Le spectre ESEEM obtenu pour l'échantillon Fe^{II}-NO +NOHA/+H₄B de iNOSoxy, dans les mêmes conditions expérimentales, a également permis la détection d'un couplage spin-proton, et la constante de couplage a été déterminée à $\approx 5,5$ MHz. Par ailleurs, ces résultats sont à accompagner de diverses remarques. Tout d'abord, dans chaque cas, l'amplitude du signal est très faible, ce qui le rend peu significatif, sauf à attribuer ce couplage à l'espèce (C), très minoritaire à la température de l'expérience (4 K). Par ailleurs, un si faible signal pour le proton libre, à ($2 \omega_H$), alors que les échantillons sont en solution aqueuse, suggère que le spin électronique du complexe Fe^{II}-NO, par le biais duquel le signal est mesuré, est isolé du solvant, ou encore que l'hème est très confiné dans la protéine. Enfin, les spectres enregistrés indiquent beaucoup de couplages avec des noyaux azote qu'il serait intéressant d'étudier, notamment pour comprendre comment se répartit la densité électronique à l'hème [200, 201].

Afin de confirmer l'existence de ce couplage, l'échantillon le plus concentré, soit Fe^{II}-NO +Arg/+H₄B, a ensuite été analysé par spectroscopie ENDOR. La figure IV.19 présente les spectres enregistrés à différentes valeurs de champ magnétique (B). Plusieurs signaux attribuables à des protons sont observés dans les spectres ENDOR. L'un d'entre eux présente

un couplage hyperfin $a_{\text{max}} \approx 7,5$ MHz, ce qui est en accord avec la valeur précédemment mesurée par spectroscopie ESEEM. Cependant ces résultats sont préliminaires et nécessiteront une analyse théorique plus poussée.

Nous avons ensuite voulu vérifier la nature de l'interaction par préparation d'un échantillon $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} + \text{Arg}/+\text{H}_4\text{B}$ dans une solution de D_2O . En effet, si il s'agit d'une liaison hydrogène, le proton devrait s'échanger rapidement avec un deutérium du solvant, ce qui se traduirait par une modification des spectres enregistrés par RPE à impulsions. Cependant la préparation d'échantillons en solvant deutéré est une difficulté supplémentaire à ajouter à celle de la construction de complexes stables de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$. En effet, un premier échantillon a été préparé mais aucune modification n'a été observée sur les spectres ENDOR enregistrés. Ceci pourrait être lié au maintien sur glace de la protéine au cours des étapes de construction du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$, qui aurait pour effet de défavoriser l'échange proton/deutérium. Ainsi nous proposons, lors de prochains essais, de préparer ces échantillons à température ambiante.

Ces études préliminaires par spectroscopie RPE à impulsions ont ouvert de nouvelles pistes pour la caractérisation des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ des NOSs. En effet, nous avons mis en évidence l'observation d'un couplage entre le spin électronique et un proton, pouvant témoigner de l'existence d'une liaison hydrogène avec une molécule d'eau ou avec le substrat. Par ailleurs, de nombreux couplages avec des azotes ont été observés et il serait également intéressant de les caractériser afin de comprendre comment se répartit la densité de spin à l'hème. Enfin, en plus de l'étude comparative des différents complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ pouvant être formés au site actif des NOSs, nous proposons de réaliser toutes ces expériences à partir de substrats marqués (^{15}N) pour, à terme, identifier les interactions qui régissent la réactivité des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$.

2.4. Discussion et perspectives :

L'ensemble de ces résultats nous permet de poser de nouvelles bases pour l'étude de la réaction « cytotoxique » des NOSs. En effet, notre première approche a consisté à vouloir réaliser une étude structure/fonction des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de NOS afin de comprendre quels paramètres pouvaient régir leur réactivité. Cependant, les expériences menées par spectroscopie RPE indiquent qu'au sein d'une même isoforme, la géométrie adoptée par le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ semble intrinsèquement dépendre de la température. Ainsi à basse

température, la géométrie majoritairement adoptée par le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ ne correspondrait pas à celle de l'espèce réactive dans l'hypothèse de la génération d'un stress oxydant. Or la plupart des techniques utilisées pour déterminer les paramètres structuraux des complexes organométalliques, et en particulier la cristallographie par rayons X, sont réalisées à basse température. Ainsi, ce type d'approche ne semble pas pouvoir rendre compte de la réalité physiologique des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de NOS et permettre de comprendre quels paramètres contrôlent la réaction d'oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$.

Il semble donc qu'il faille orienter nos études vers d'autres techniques spectroscopiques telles que la spectroscopie Raman de résonance ou la spectroscopie infrarouge qui semblent être les seules à pouvoir nous apporter des informations structurales sur la conformation au site actif de la protéine à température ambiante. Cependant, l'instabilité des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ rend ces expériences délicates et laborieuses. Ainsi, nous proposons parallèlement de réaliser une étude structure/fonction des différentes isoformes de NOS par modélisation moléculaire en mode semi quantique type QM-MM (*Quantum Mechanical-Molecular Mechanical*) sur la base des travaux réalisés par M. L. Fernández [206]. En effet, si ce genre d'étude se base sur des données structurales obtenues par cristallographie à basse température, l'introduction d'une dynamique moléculaire pourrait peut être permettre d'obtenir des informations sur la répartition de la densité électronique au site actif de la protéine, en partant par exemple d'un complexe Fe^{II} n'ayant pas encore fixé le ligand diatomique.

Par ailleurs il sera toujours intéressant de comparer les enregistrements RPE obtenus à température ambiante pour les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ des différentes isoformes de NOS, dans un premier temps en bande X puis, dans un second temps, à plus haute valeur de champ (bande Q). En effet, si dans ces conditions les couplages hyperfins ne seront *a priori* pas observables, cette étude pourrait nous permettre d'obtenir les spectres RPE des formes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ impliquées dans la réaction cytotoxique de chaque isoformes avec, en haut champ, une meilleure résolution des valeurs de g.

Chapitre V.
Conclusions Générales

Dans un premier temps, nous avons démontré que si du peroxynitrite était synthétisé directement au site catalytique des NOSs (par oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$), il ne serait pas libre de diffuser vers le milieu extérieur. En effet, quelle que soit l'isoforme et les conditions physiologiques (valeur du pH, concentration en CO_2 ...), le peroxynitrite est immédiatement et intégralement pris en charge par l'enzyme pour conduire à la formation d'autres oxydes d'azote.

La combinaison d'études cinétiques et de réactivité nous a amenés à proposer un premier modèle pour la réaction entre iNOSoxy et PN. Après une étape de fixation du peroxynitrite par l'atome d'oxygène au fer de l'hème, formant un complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OONO}]$, la réaction se diviserait en deux voies : 1) une première voie d'activation du peroxynitrite qui conduirait à la synthèse d'espèces oxydantes et nitrantes ; 2) une seconde voie, probablement d'isomérisation du peroxynitrite, qui produirait des espèces inertes (nitrates, nitrites).

Dans le cas d'une activation du peroxynitrite par iNOSoxy, le complexe $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OONO}]$ évoluerait par rupture homolytique de la liaison O-O pour former au site actif un complexe $[\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}]$ et un radical $\cdot\text{NO}_2$, libre de diffuser hors de la poche de l'hème. Le complexe oxoferryl, qui pourrait correspondre à l'espèce observée par spectroscopie d'absorption avec un maximum autour de 443 nm, réaliserait alors l'oxydation à un électron de biomolécules du milieu extérieur (petites molécules bio-organiques ou peptides), ensuite à même de recombinaison avec le radical $\cdot\text{NO}_2$ pour former des produits nitrés.

Dans le cas d'une production d'espèces dites inertes (nitrates, nitrites), nous proposons que le mécanisme puisse correspondre à une isomérisation concertée du PN fixé au fer, sans formation transitoire d'un intermédiaire à haut degré d'oxydation, comme il a été postulé par S. Herold dans le cas des globines.

Les paramètres qui orientent la catalyse de la décomposition du PN vers l'une ou l'autre de ces voies (activation *versus* isomérisation) restent à identifier. Cependant, il semble que la valeur du pH y contribue, ce qui nous a amenés à proposer que la rupture homolytique de la liaison O-O du PN, qui conduit à la formation de l'intermédiaire oxoferryl, puisse être assistée par la présence d'un proton supplémentaire.

L'analyse cinétique de la réaction entre différentes NOSs et le peroxynitrite suggère que le mécanisme de la réaction soit le même pour toutes les isoformes. Par ailleurs, nous avons observé une grande diversité de réactivité du système $\{\text{NOS} + \text{PN}\}$ suivant l'isoforme considérée. En effet, il semble que les isoformes inductible et neuronale de mammifères

puissent générer des RNSs capables d'oxyder et de nitrer des biomolécules, tandis que l'isoforme bactérienne semble détoxiquer totalement le peroxyxynitrite. Ainsi nous avons proposé qu'à certaines étapes-clefs, les paramètres structuraux propres à chaque isoforme puissent orienter la réaction vers des processus toxiques ou non.

Pour cela, nous proposons que le devenir de la paire $\{\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}\cdots\text{NO}_2\}$, et en particulier l'échappement des radicaux $\cdot\text{NO}_2$, soit intimement contrôlé par l'environnement de l'hème. En effet, une fois formé, ce système pourrait suivre deux voies : 1) une voie dite toxique correspondant à l'oxydation suivie de la nitration de biomolécules du fait de l'échappement du radical $\cdot\text{NO}_2$ (iNOSoxy, nNOSoxy) ; 2) une voie dite de détoxification due à la recombinaison directe entre l'oxoferryl et le radical $\cdot\text{NO}_2$ pour produire des nitrates et/ou des nitrites (bsNOS). Ainsi, l'encombrement stérique exercé par la substitution d'un résidu valine par une isoleucine au site catalytique de l'isoforme bactérienne pourrait être la cause de la différence de réactivité entre bsNOS et les isoformes de mammifères. En effet, cette contrainte pourrait suffire à piéger les radicaux ($\cdot\text{NO}_2$) formés dans la poche de l'hème et les forcer à emprunter la voie de détoxification par réaction sur l'oxoferryl, alors que dans le cas des isoformes de mammifères, ils seraient libres de diffuser vers le milieu extérieur.

Ainsi il serait intéressant de réaliser l'ensemble de ces expériences à partir d'un mutant de NOS bactérienne pour lequel l'isoleucine aurait été substituée par une valine et d'observer si dans ce cas nous pouvons retrouver la réactivité « toxique » des NOSs de mammifères.

Enfin d'autres facteurs d'ordre cinétique, et peut être thermodynamique, pourraient également intervenir. Par exemple, l'intermédiaire oxoferryl de la NOS de bactérie est plus persistant, et donc peut être moins réactif, que celui des NOSs de mammifères. De plus, à une valeur de pH donnée, cet intermédiaire semble être formé en plus grande proportion que celui des isoformes de mammifères, ce qui pourrait rendre compte d'une meilleure efficacité de la réaction de détoxification *via* la formation de la paire $\{\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}\cdots\text{NO}_2\}$ et sa recombinaison, que *via* l'isomérisation concertée du peroxyxynitrite catalysée par l'enzyme.

Par ailleurs, cette différence de réactivité entre isoformes est d'autant plus intéressante qu'elle pourrait être directement corrélée à leur rôle biologique. En effet, l'isoforme inductible est celle pour laquelle nous avons observé le plus fort potentiel cytotoxique, jusqu'à deux fois celui du peroxyxynitrite, ce qui n'est peut être pas sans rapport avec son implication dans les processus de défense immunitaire. L'isoforme neuronale, elle, semble pouvoir engendrer une toxicité comparable à celle du peroxyxynitrite, qui pourrait rendre compte d'un potentiel de dégénérescence de l'enzyme, dans les conditions physiologiques particulières d'un état

pathologique donné (maladies neurodégénératives). Enfin, la capacité de l'isoforme bactérienne bsNOS à détoxifier totalement le peroxynitrite suggère une fonction protectrice de cette protéine *NOS-like*, qui pourrait représenter une première piste pour l'élucidation de son rôle physiologique.

Enfin, nous avons pu observer que dans certaines conditions expérimentales les NOSs sont sensibles à leur production de RNSs. En effet, la prise en charge par les NOSs d'un excès de peroxynitrite semble conduire à leur inhibition, par altération du ligand cystéine proximal (oxydation), voire de résidus clefs du site catalytique (nitration de tyrosine et/ou de tryptophane), ce qui n'est pas observé en conditions de stoechiométrie.

Cependant ces processus d'auto-inhibition catalytique, en plus de pouvoir être réversibles, semblent dépendre d'autres facteurs que la dose de peroxynitrite, et notamment de la présence, ou plutôt de l'absence, de biomolécules dans l'environnement des NOSs pour servir de cibles aux réactions « toxiques ». Ceci nous amène à soulever l'hypothèse d'un mécanisme de régulation de la production de RNSs par les NOSs. Ainsi, une production discrète et contrôlée de RNSs et, dans le cas de l'isoforme inducible, induite par la présence d'un pathogène, serait permise, tandis qu'une surproduction de RNSs serait empêchée par un mécanisme d'auto-inhibition catalytique. Par ailleurs, il est intéressant ici de noter que ce processus, en plus d'assurer la régulation du cycle catalytique des NOSs, pourrait également éviter l'exaltation par les NOSs de la toxicité d'un peroxynitrite synthétisé *via* la réaction du NO avec les ions superoxyde, non contrôlée autrement que par la diffusion.

Pour finir, il est important de rappeler que la réaction dite toxique des NOSs ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO} + \text{O}_2$), et par là même la biosynthèse de peroxynitrite au site actif, dépend intrinsèquement des paramètres physico-chimiques du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ et de sa réactivité avec le dioxygène au site actif des différentes isoformes. L'identification de ces paramètres et la caractérisation de l'influence qu'ils exercent sur la réaction constituent les prochains enjeux pour la compréhension de la spécificité biologique des différentes NOSs.

Ainsi nous avons développé une méthodologie originale, par spectroélectrochimie, qui permettra la détermination directe du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}/\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO}$ des différentes NOSs. Cette donnée peut représenter une information cruciale pour la réactivité des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$, en particulier si cette étude est réalisée dans différentes conditions d'environnement de l'hème (substrat, co-facteur) et pour les différentes isoformes de NOSs.

Ensuite, nous avons cherché à obtenir des informations sur la géométrie et les propriétés électroniques des complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ et avons pour cela initié une étude par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique. Ceci nous a permis de mettre en évidence l'existence de trois espèces distinctes, dont deux seraient en équilibre thermique. Ainsi nous avons démontré que les études structurales réalisées sur les complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de NOS à basse température (cristallographie) ne pouvaient *a priori* permettre de représenter la réalité physiologique et qu'il faudra toujours privilégier des techniques qui opèrent à température ambiante, telle que la spectroscopie Raman de résonance.

Ces expériences, répétées dans différentes conditions de substrat, de co-facteur et d'isoforme, ont permis d'ouvrir de nouvelles perspectives pour la compréhension des interactions stabilisant le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ dans la poche de l'hème. En particulier, des différences significatives dans l'équilibre thermique entre les espèces $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de géométries distinctes ont pu être observées en absence du co-facteur H_4B , condition pour laquelle la formation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ et donc le passage potentiel des NOSs par le cycle de production de RNSs sont favorisés.

Ces travaux de recherche représentent la première étude de l'interaction entre le peroxy-nitrite et les NO-synthases et met en évidence la capacité des NOSs à générer, amplifier ou éteindre un stress oxydant cellulaire. Ces travaux constituent la base de nouveaux projets que le laboratoire développe actuellement, et qui permettront de mieux comprendre le mécanisme et la spécificité physiologique des isoformes de NO-synthase.

Annexes

1. Surexpression et purification de iNOSoxy.

Les bactéries transformées sont inoculées dans 6 mL de milieu de culture TB (*Terrific Broth* de Sigma, +10 % glycérol) dans des tubes à culture stériles T406-2A[®] (Simport) en présence de 125 µg.mL⁻¹ ampicilline, puis incubées à 37 °C, sous agitation (250 tr.min⁻¹), pendant 8 h. Les solutions et verreries utilisées ont été stérilisées au préalable par autoclavage.

Une solution stock de la souche bactérienne est reconstituée en ajoutant 750 µL d'une solution cryo-protectrice (glycérol : eau, 1 : 1) à un même volume de pré-culture dans des tubes Cryoware[®] (Nalgene). Le mélange est ensuite rapidement congelé dans l'azote liquide et stocké à -80 °C. Le volume de pré-culture restant est ajouté, dans un erlenmeyer de 2 L, à 450 mL de milieu TB en présence de 125 µg.mL⁻¹ ampicilline, puis incubé la nuit à 37 °C sous agitation (250 tr.min⁻¹).

Le lendemain quatre cultures bactériennes sont ré-inoculées, dans des erlenmeyers de 2 L, à partir de 100 mL de la culture précédente et 400 mL de milieu TB en présence de 125 µg.mL⁻¹ ampicilline. Après 15 min d'incubation à 37 °C, sous agitation, les cultures présentant une D. O. comprise entre 0,8 et 1 à 600 nm sont induites en ajoutant 1 mM IPTG (IsoPropyl-β-D-ThioGalacto-pyranoside) et 400 µM d'acide δ-amino lévulénique, permettant l'induction de la synthèse de l'hème, puis laissées à 25 °C sous agitation 200 tr.min⁻¹.

Après 3 jours de culture, les bactéries sont rassemblées par centrifugation à 3.000 g (centrifugeuse Beckman, rotor JA-10), 4 °C, pendant 35 min puis re-suspendues dans 80 mL de tampon de lyse (KPi 40 mM pH=7,4, glycérol 10 %, NaCl 250 mM, EDTA 1 mM, aprotinine 5 µg.mL⁻¹, leupeptine 1 µg.mL⁻¹, pepstatine A 5 µg.mL⁻¹, pefabloc SC 120 µg.mL⁻¹, lysozyme 1 mg.mL⁻¹, PMSF/DMSO 1 mM, ± 50 µM H₄B ou H₂B). L'action combinée des lysozymes et de la pression osmotique permet la rupture de la membrane des bactéries, et ainsi, la libération de leur contenu. La lyse est accentuée par un choc thermique de trois cycles de congélation rapide, dans l'azote liquide, suivie d'une décongélation dans un bain-marie à 37 °C. Le lysat obtenu est maintenu dans la glace. L'ADN bactérien, responsable de la viscosité du lysat, est fragmenté par addition de 50.000 unités.L⁻¹ de DNase dans le milieu (dilution 1 / 750), puis par sonication (Vibra-Cell 75042, Bioblock, amplitude 40, 50 W, par impulsions de 2 s) en 5 cycles de 1 min pour 15 mL de lysat.

Les extraits cellulaires lysés sont ultracentrifugés à 20 000 g, 4 °C, pendant 30 min, permettant ainsi la séparation des extraits solubles des vésicules membranaires. Les protéines contenues dans le surnageant sont ensuite progressivement précipitées par addition, sur 1 h, de 0,291 g.mL⁻¹ sulfate d'ammonium. La solution est laissée 2 h à 4 °C sous agitation. Le

précipité est culotté à 20.000 g, 4 °C, pendant 30 min, avant d'être solubilisé dans 50 mL de tampon de re-suspension (Tris 40 mM pH=7,4, glycérol 10 %, NaCl 250 mM, PMSF/EtOH 1 mM, \pm 50 μ M H₄B ou H₂B). Une dernière centrifugation 45 min à 4 °C permet de se débarrasser des dernières impuretés avant purification par chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel (résine His-Bind[®], Novagen).

La purification de iNOSoxy a lieu en chambre froide (8 °C). La colonne de Nickel est équilibrée avec le tampon MCAC (*Metal Chelate Affinity Chromatography*, Tris 40 mM pH=7,4, glycérol 10 %, NaCl 250 mM, PMSF / EtOH 1 mM, \pm 50 μ M H₄B ou H₂B) contenant 5 mM imidazole afin d'occuper les sites de fixation non spécifiques. La solution de protéines obtenue précédemment est chargée sur la colonne de résine. Plusieurs cycles de rinçages sont effectués avec du tampon MCAC contenant des quantités croissantes d'imidazole (5 - 60 mM). A ce stade, les protéines majoritairement retenues sont *a priori* iNOSoxy. Elles sont éluées par deux volumes de tampon MCAC + 160 mM d'imidazole. Des fractions de 1 mL sont collectées puis rassemblées en trois catégories, en fonction de leur teneur en protéine : la tête, le cœur (fraction la plus concentrée) et la queue (fraction présentant le moins d'impuretés). La protéine iNOSoxy possédant un chromophore héminique qui émet dans le visible (jaune-orange), les fractions contenant la protéine sont appréciées visuellement.

Chaque fraction est ensuite dialysée à quatre reprises contre 200 fois le volume de tampon phosphate KPi 50 mM pH=7,4 + 250 mM NaCl (\pm 50 μ M H₄B ou H₂B), pour éliminer l'excès d'imidazole.

Les trois fractions sont échantillonnées à raison de 50 ou 200 μ L dans des tubes cryogéniques avant congélation dans l'azote liquide pour conservation à -80 °C.

2. Spectrométrie de masse :

2.1. Principe :

La spectrométrie de masse est une technique qui permet de déterminer avec une bonne précision et une sensibilité élevée la masse des molécules. Cette technique est devenue une approche quasi incontournable dans l'étude et la caractérisation des biomolécules, notamment pour l'étude structurale des peptides et des protéines. Elle est aujourd'hui couramment utilisée pour mettre en évidence des différences de masse moléculaire correspondant à des mutations ponctuelles, des ponts disulfure ou des modifications post-traductionnelles (ex : glycosylation, phosphorylation) sur les protéines.

Le spectromètre de masse est un outil analytique qui permet de transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux, puis de les séparer en fonction de leur rapport masse/charge, noté m/z . Il est toujours constitué des éléments suivants : 1) une source d'ions dans laquelle se produit le passage en phase gazeuse de l'échantillon à analyser (vaporisation, sublimation, désorption), l'ionisation des ions et leur décomposition ; 2) un analyseur qui permet de trier les ions en fonction de leur rapport m/z ; 3) un détecteur qui compte les ions en leur associant leur rapport m/z ; 4) un enregistreur pour le traitement du signal et la visualisation des spectres ; 5) un système d'étalonnage qui permet de corrélérer la grandeur réelle mesurée par l'instrument et le rapport m/z .

Différents modes d'ionisation peuvent être utilisés en fonction des molécules analysées. L'ESI (*Electron Spray Ionization*) et le MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) sont parmi les méthodes d'ionisation douce, c'est-à-dire que l'énergie communiquée à l'ion moléculaire au cours de l'ionisation sous forme d'énergie interne est faible, ce qui permet d'éviter dans la source une fragmentation massive des biomolécules.

Les analyseurs classiques le plus souvent associés à ces deux sources sont le filtre quadripolaire (ou quadripôle), la trappe ionique, le temps de vol (TOF, *Time Of Flight*), et toutes les combinaisons de ces analyseurs.

La sensibilité est généralement estimée globalement pour l'association d'un type de source d'ions et d'un analyseur. Elle varie actuellement entre 10^{-12} et 10^{-15} mole avec les appareils les plus récents.

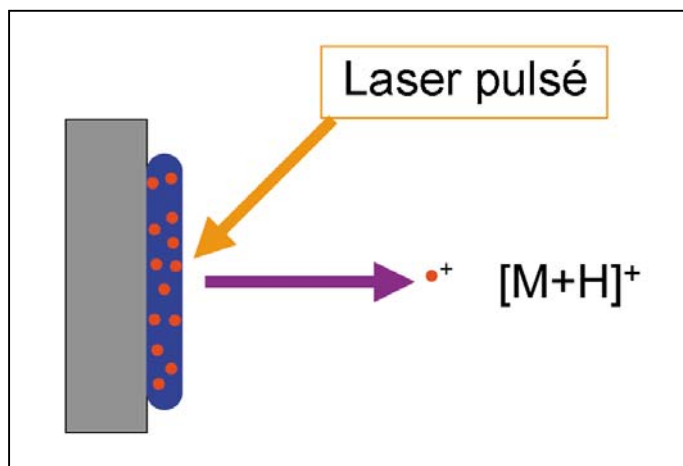


Figure A.1. Principe du mode d'ionisation MALDI. La matrice est en bleu et l'échantillon en rouge.

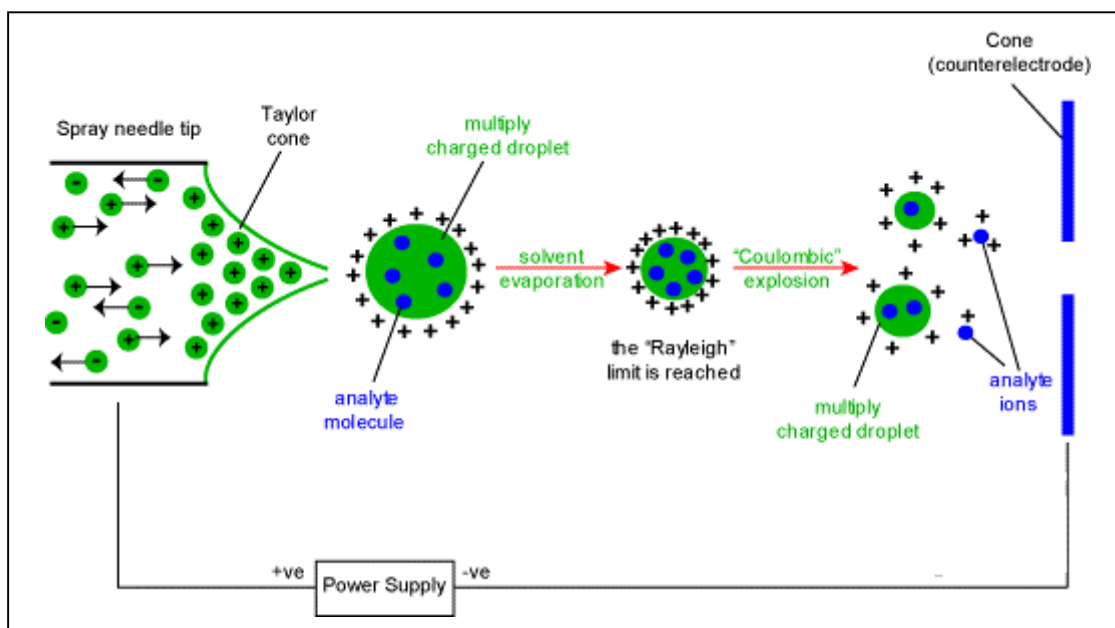


Figure A.2. Principe de la désolvatation et ionisation en électronébulisateur (ESI, *ElectroSpray Ionisation*).

MALDI-TOF :

La technique MALDI utilise en général un faisceau laser pulsé travaillant dans l'UV pour désorber et ioniser un mélange matrice/échantillon co-cristallisé sur une surface métallique. L'irradiation laser provoque l'éjection des molécules d'échantillon et de matrice en phase gazeuse. La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie du faisceau laser incident. L'énergie transmise par le laser est absorbée par la matrice, et cet apport d'énergie provoque son expansion en phase gazeuse, entraînant les molécules d'échantillon.

L'échantillon est ionisé majoritairement par transfert de protons, soit avant désorption dans la phase solide, soit par collision après désorption avec la matrice excitée ou avec d'autres molécules du plasma pour former des ions de type $[M+nH]^{n+}$ (fig. A.1).

Le MALDI est généralement utilisé en association avec l'analyseur en temps de vol (TOF) qui est bien adapté à la nature pulsée de la désorption MALDI. Les ions formés dans la source par impact laser sont accélérés par un champ électrique uniforme intense. Tous les ions, possédant un rapport m/z donné, acquièrent la même énergie cinétique. Les ions entrent alors dans un analyseur libre de champ (tube de vol), où ils gardent une vitesse constante, acquise dans la zone d'accélération. Le temps que les ions vont mettre pour atteindre le détecteur placé à l'autre extrémité du tube de vol, sera corrélé à leur rapport m/z . Les ions de rapport m/z le plus petit arriveront les premiers. Ainsi la mesure du temps de vol des ions permet de déterminer leur rapport m/z . En théorie un analyseur TOF permet de mesurer des masses infiniment élevées. En pratique, et associé au MALDI, la limite est d'environ 300 kDa.

ESI-FTICR :

L'ESI est la technique d'ionisation à pression atmosphérique la plus couramment utilisée pour l'analyse des macromolécules. Le composé est désolvaté et ionisé à partir d'une solution injectée dans un capillaire conducteur qui est porté à un haut potentiel électrique (quelques kV). Sous l'influence d'un champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire, la solution est nébulisée avec formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Pendant ce transport, la taille des gouttelettes diminue par évaporation du solvant par explosion « coulombiennes » successives (divisions spontanées de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites, provoquées par une charge surfacique très élevée) (fig. A.2). Un flux de gaz (azote) est appliqué à l'interface pour aider

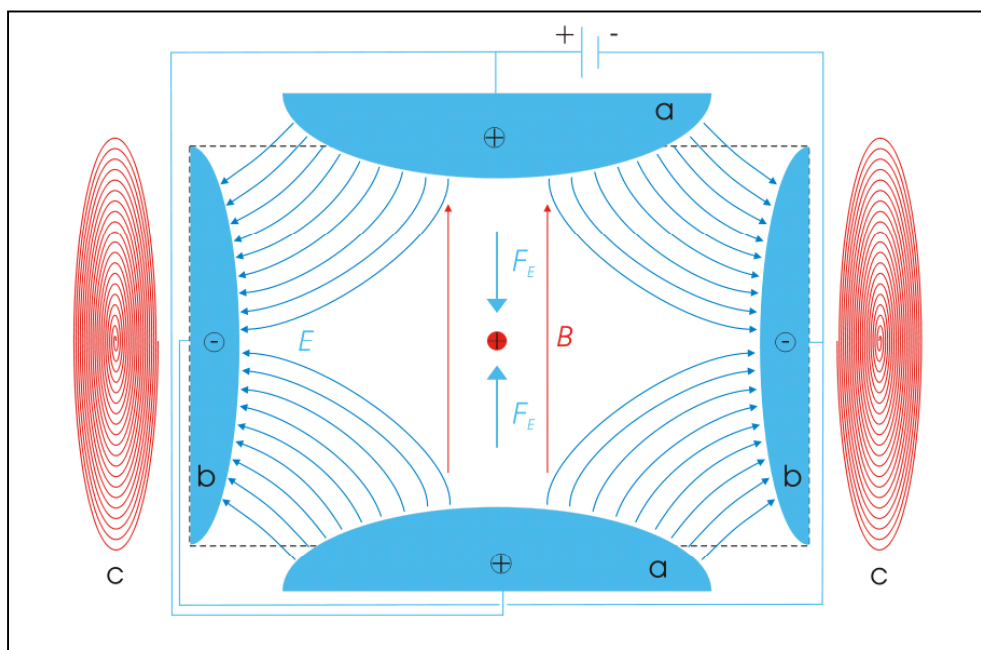


Figure A.3. Schéma d'une cellule ICR, ou piège de Penning, contenant une particule de charge positive en son centre (rouge). Le champ électrique E (bleu) est produit par deux plaques chargées positivement (a) et par une électrode circulaire chargée négativement (b). Le champ magnétique homogène B (rouge) est produit par un électro-aimant toroïdal (c).

l'évaporation du solvant. L'interface permet le transfert des ions de la source opérant à pression atmosphérique à l'analyseur opérant à des pressions de l'ordre de 10^{-6} mbar, le but étant d'éliminer le maximum de fragments neutres. Ce filtrage est obtenu soit par chauffage de l'interface, soit par utilisation d'interfaces à rideau de gaz. Les ions formés sous pression atmosphérique sont alors canalisés par un ensemble d'échantillonneurs (ensemble d'orifices sous vide) vers l'analyseur où règne un vide poussé.

L'analyseur à résonance cyclotronique d'ion se compose d'une cellule ICR (*Ion Cyclotron Resonance*) cubique, qui comporte six plaques sous tension, isolées les unes des autres. L'application d'un champ magnétostatique B suivant l'axe z soumet les ions à la force de Lorentz. Leur mouvement dans le plan (xy) est alors « cyclotronique », c'est-à-dire circulaire uniforme de fréquence inversement proportionnelle au rapport m/z . Les ions sont par ailleurs confinés suivant l'axe z par un champ magnétique électrostatique imposé par deux plaques parallèles au plan (xy) , résultant de l'application d'une tension faible (fig. A.3).

Une fois piégés dans la cellule, les ions ont donc la même trajectoire mais pas la même position à un instant déterminé. Il convient donc de donner aux ions de même m/z un mouvement d'ensemble en les mettant en phase, par résonance cyclotronique. Pour cela, les ions m/z sont excités par un champ alternatif de fréquence correspondant à leur fréquence cyclotron : pour exciter tous les ions d'une même gamme de m/z , une tension contenant toutes les fréquences cyclotron correspondantes est imposée. Les ions sont alors accélérés, mis en phase et voient le rayon de leur orbite augmenter.

Le courant induit par le mouvement cohérent des ions de même m/z sera mesuré sur les plaques de détection : ce sera une sinusoïde amortie de fréquence cyclotronique. Le courant induit total mesuré sera donc la somme de sinusoïdes amorties de fréquences cyclotroniques correspondant aux ions de m/z excités par résonance. La fréquence cyclotron étant inversement proportionnelle au rapport m/z , l'inverse de la transformée de Fourier du courant obtenu permet d'aboutir au spectre de masse en m/z .

2.2. Masses des 51 fragments obtenus après digestion de iNOSoxy par la trypsine.

Cette liste correspond aux masses (MH^+) des 51 fragments obtenus après digestion totale de iNOSoxy par la trypsine (noir).

Sont indiquées en rouge et en vert, entre parenthèses, les masses des fragments dont les résidus tyrosine et tryptophane ont été nitrés respectivement. L'ajout d'un groupe $-NO_2$ entraîne une différence de masse de +45 Da. iNOSoxy compte 18 résidus tyrosine et 14 résidus tryptophane, répartis sur 20 fragments potentiellement modifiables par nitration.

- 1 MACPWK : 735.3316 (780)
- 7 FLFK : 554.3337
- 11 VK : 246.1812
- 13 SYQSDLK : 840.4098 (885)
- 20 EEK : 405.1980
- 23 DINNNVK : 816.4210
- 30 K : 147.1128
- 31 TPCAVLSPTIQDDPK : 1584.7937
- 46 SHQNGSPQLLTGTAQNVPESLDK : 2421.2004
- 69 LHVTSTRPQYVR : 1456.8019 (1501.8)
- 81 IK : 260.1968
- 83 NWGSGEILHDTLHHK : 1743.8561 (1789)
- 98 ATSDFTCK : 872.3818
- 106 SK : 234.1448
- 108 SCLGSIMNPK : 1049.5118
- 118 SLTR : 476.2827
- 122 GPR : 329.1932
- 125 DK : 262.1397
- 127 PTPLEELLPHAIEFINQYYGSFK : 2706.3813 (2751/2796)
- 150 EAK : 347.1925
- 153 IEEHLAR : 867.4683
- 160 LEAVTK : 660.3926
- 166 EIETTGTQYQLTLDELIFATK : 2286.1751 (2331)
- 186 MAWR : 563.2758 (608)
- 190 NAPR : 457.2517
- 194 CIGR : 448.2336

198 IQW^{SNLQVFDAR} : 1476.7594 (1522)
 210 NCSTAQEMFQHICR : 1667.7087
 224 HIL^YATNNGNIR : 1385.7284 (1430)
 236 SAITVFPQR : 1018.5680
 245 SDGK : 406.1932
 249 HDFR : 574.2732
 253 L^WNSQLIR : 1029.5840 (1075)
 261 ^YAG^YQMPDGTIR : 1371.6361 (1416/1461)
 273 GDAATLEFTQLCIDL^GW^K : 1980.9735 (2026)
 291 PR : 272.1717
 293 ^YGR : 395.2037 (440)
 296 FDVLPLVLQADGQDPEVFEIPDLVLEVTMEHPK : 3829.9607
 330 ^YE^WFQELGLK : 1312.6572 (1357) (1402)
 340 ^W^YALPAVANMLLEVGGLEFPACPFNG^W^YMGTEIGVR : 3971.9321 (4016/4061)
 (4106/4151)
 376 DFCDTQR : 884.3567
 383 ^YNILEEVGR : 1092.5684 (1137)
 392 R : 175.1189
 393 MGLEHTLASL^WK : 1486.7722 (1532)
 406 DR : 290.1459
 408 AVTEINVAVLHSFQK : 1655.9115
 423 QNVTIMDHHTASESFMK : 1975.9000
 440 HMQNE^YR : 977.4258 (1022)
 447 AR : 246.1560
 449 GGCPAD^W^I^WLVPPVSGSITPVFHQEMLN^YVLSPF^Y^Y^YQIEP^WK : 5027.4615
 (5072/5117/5162/5207) (5252/5297/5342)
 492 THI^WQNEHHHHHH : 1749.7853 (1795)

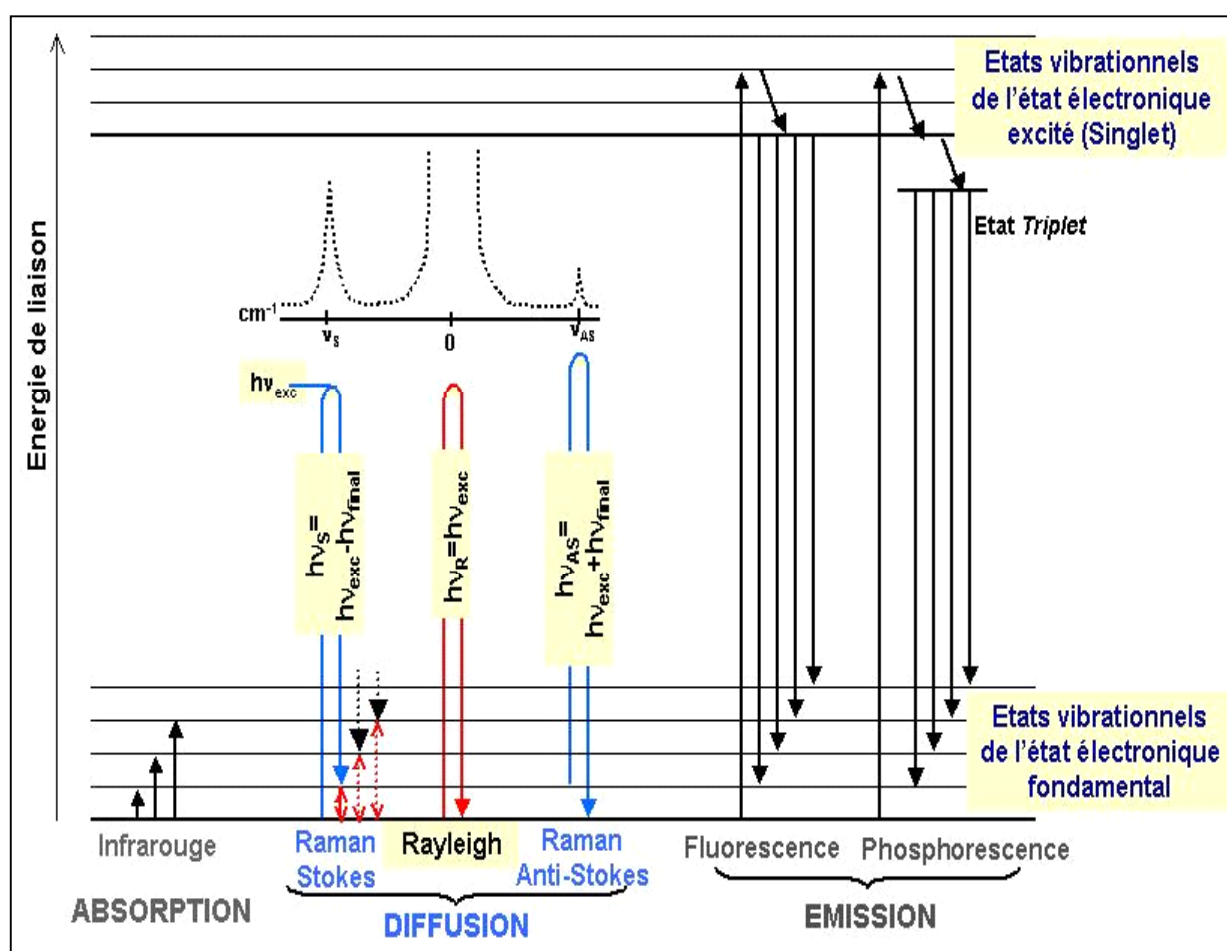


Figure A.4. Diagramme de Jablonski présentant les différents processus d'interaction d'une molécule fictive avec la lumière. Les phénomènes de diffusion de la lumière élastique (Rayleigh) et inélastique (Raman, stokes et anti-stokes) sont mis en évidence.

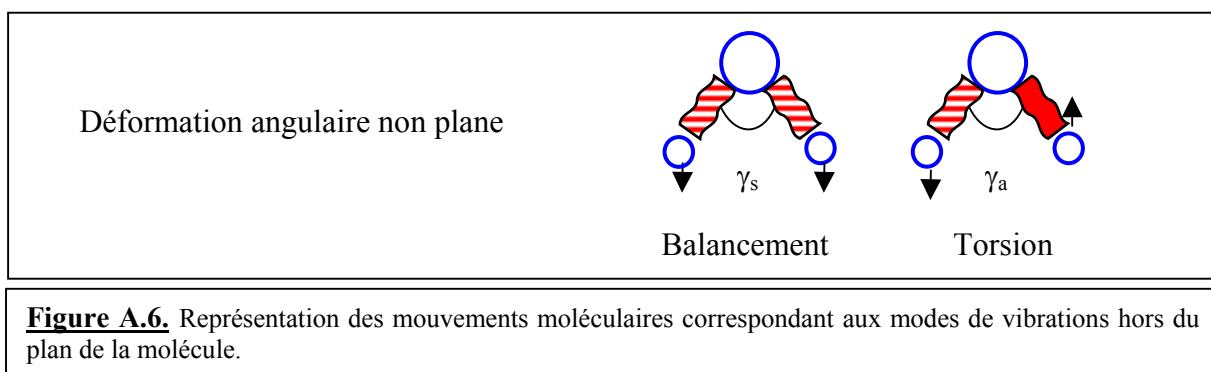
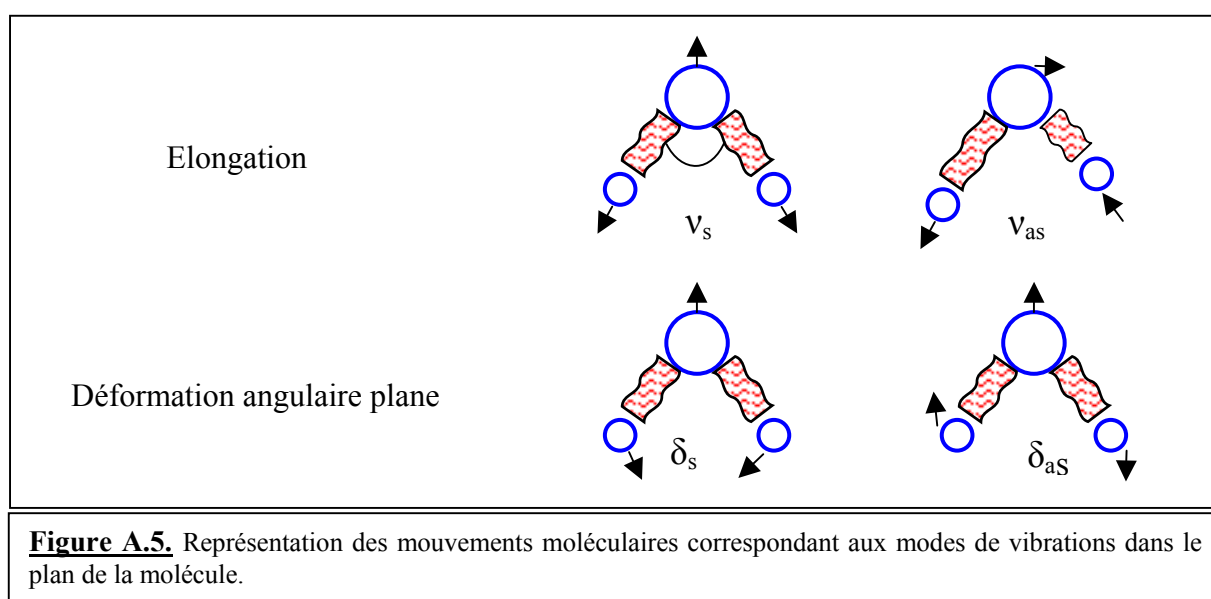
3. Principe de la spectroscopie Raman de résonance.

La spectroscopie Raman de résonance est une technique vibrationnelle puissante et fiable pour l'obtention d'informations détaillées sur la structure des complexes métalliques et des métaux dans les systèmes biologiques (notamment le site actif des protéines). En effet, cette technique vibrationnelle permet d'obtenir un degré de résolution élevé pour les informations structurales (sub-moléculaire), notamment la nature chimique des ligands du métal, leur force de liaison, leurs conformations et/ou leurs configurations ou encore les interactions du site actif avec son environnement (liaisons hydrogène) [207, 208].

L'effet Raman correspond à un processus de diffusion de la lumière découvert en 1928 par C. V. Raman, et rapporté figure A.4. La fréquence des vibrations moléculaires correspond à la région infrarouge du spectre électromagnétique. La transition vers un état vibrationnel excité peut être réalisée de deux manières : 1) par absorption directe d'une lumière infrarouge correspondant à l'énergie de la transition vibrationnelle (spectroscopie infrarouge) ; 2) par diffusion Raman inélastique en utilisant un intense faisceau de lumière monochromatique d'un laser dans la région du spectre UV-visible électromagnétique.

Quand la lumière monochromatique émise par un faisceau laser de fréquence ν_0 , est propagée à travers un matériel isotrope (gaz, liquide ou solide) que constitue notre échantillon, elle est réfléchiée, absorbée, transmise, et également diffusée. La diffusion de la lumière se fait majoritairement de manière élastique ($\nu_{\text{diff}} = \nu_0$) : c'est la diffusion Rayleigh. Cependant une faible fraction de la lumière est diffusée de manière inélastique ($\nu_{\text{diff}} \neq \nu_0$) et contient l'information vibrationnelle caractéristique de l'énergie des sous-niveaux vibrationnels (ν_{vib}) de la molécule [207, 208] : c'est la diffusion Raman. Ainsi sur un spectre Raman, de part et d'autre de la bande Rayleigh, sont observées les bandes Raman stokes ($\nu_{\text{diff}} = \nu_0 - \nu_{\text{vib}}$) et anti-stokes ($\nu_{\text{diff}} = \nu_0 + \nu_{\text{vib}}$).

La spectroscopie Raman de résonance est un cas particulier de la spectroscopie Raman, qui permet l'étude sélective d'un chromophore. Ce phénomène de résonance se produit lorsque la longueur d'onde d'excitation du laser correspond à une transition électronique permise du chromophore d'intérêt (visualisée sur le spectre d'absorption UV-visible). Il y a alors amplification de l'effet Raman, jusqu'à $\times 10^6$: c'est l'effet Raman de résonance. Lorsque la longueur d'onde d'excitation du laser approche seulement la bande d'absorption UV-visible du chromophore, une faible exaltation dite de pré-résonance est observée. Ainsi, le spectre



vibrationnel du chromophore va être exalté spécifiquement, ce qui permet de minimiser les contributions des autres composés, qu'ils proviennent de la protéine ou du solvant. Toutes les bandes du spectre Raman ne sont cependant pas exaltées au même niveau. Les intensités relatives des bandes Raman reflètent le changement de la polarisabilité moléculaire associé à chaque vibration. Les bandes qui présentent le plus fort degré d'exaltation sont celles qui correspondent aux vibrations (dans l'état électronique fondamental) qui miment la distorsion de l'état électronique excité avec lequel il y a résonance.

Les molécules comportent des modes normaux de vibrations (mouvements vibrationnels simples) dans lesquels tous les atomes ou groupes d'atomes se déplacent simultanément, sans modifier le centre de gravité de l'édifice moléculaire [209]. Ce sont des mouvements dans le plan. Il existe cependant des modes de vibrations plus complexes qui se situent en dehors du plan de la molécule.

Dans le plan, on distingue l'élongation (ν) et la déformation angulaire (δ) qui peuvent être symétriques (δ_s et ν_s), ou antisymétriques (δ_{as} et ν_{as}) (fig. A.5). Ils se traduisent, respectivement, par des mouvements de cisaillement et de rotation des trois atomes formant l'angle θ .

Hors du plan moléculaire, il s'agit de déformations angulaires qui induisent un mouvement collectif de la molécule, symétrique (γ_s) ou antisymétrique (γ_{as}), et qui correspondent à des mouvements de torsion ou de balancement (fig. A.6).

Les modes de vibrations peuvent se combiner et donner différentes bandes Raman ne correspondant pas à des modes purs. Par exemple dans les cas où il y a des couplages forts, certaines bandes Raman ne sont pas dues à des modes purs mais sont le reflet de combinaisons des modes de déformation et/ou d'élongation.

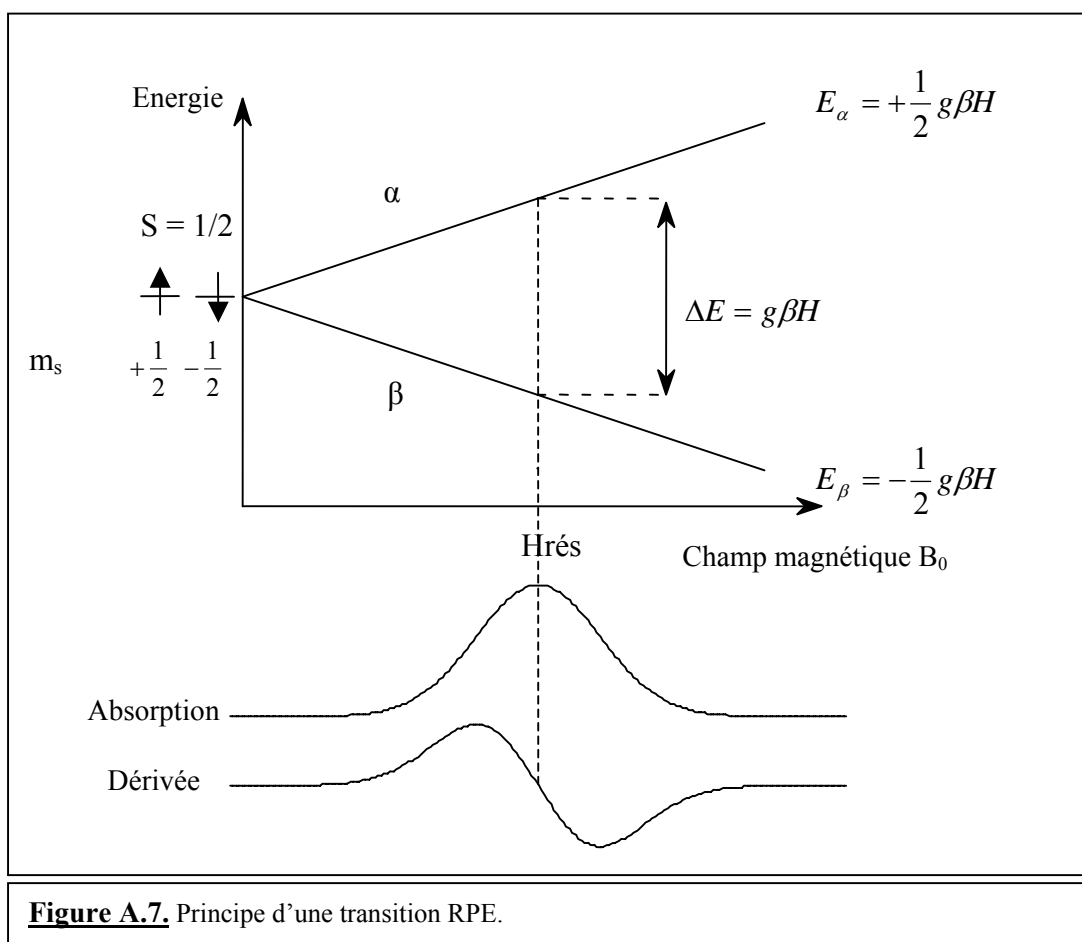


Figure A.7. Principe d'une transition RPE.

4. Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) :

4.1. Principe :

La spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une technique qui permet la détection des molécules ou atomes, dans un état de spin paramagnétique, c'est-à-dire qui comptent un ou plusieurs électrons non appariés [210]. Cette méthode peut donc s'appliquer à l'étude des radicaux libres et des ions métalliques des métalloprotéines. La RPE permet d'obtenir des informations variées sur la géométrie de coordination du système paramagnétique étudié, sa nature, son état de spin ainsi que son degré d'oxydation.

Un électron non apparié possède un moment cinétique de spin (m_s) qui peut prendre deux valeurs, $m_s = +1/2$ ou $-1/2$. En l'absence de champ magnétique extérieur ces niveaux sont dégénérés. Une molécule paramagnétique possède un spin électronique S non nul, correspondant à la somme des spins électroniques individuels des électrons de valence. Pour tout système de nombre de spin demi-entier ($S = \pm x/2$), une dégénérescence au moins double doit subsister en l'absence de champ magnétique (doublets de Kramer). Par application d'un champ magnétique H , il y a levée de dégénérescence des énergies associées aux deux états de spin (état de faible énergie $m_s = +x/2$, et état de haute énergie $m_s = -x/2$) : c'est l'effet Zeeman. La technique de RPE consiste à mesurer la différence d'énergie ΔE entre les deux états de spin, qui vérifie la relation :

$$\Delta E = g \cdot \beta \cdot H = h \cdot \nu$$

où H est la valeur du champ magnétique, ν est la fréquence micro-onde de l'onde magnétique (9,4 GHz en bande X), β est le magnéton de Bohr électronique ($9,274 \cdot 10^{-24} \text{ J.T}^{-1}$), et g est le facteur de Lande, caractéristique de l'espèce paramagnétique étudiée (2,0023 pour l'électron libre).

Expérimentalement, on envoie une onde magnétique d'énergie micro-onde (GHz) de fréquence ν et on augmente le champ magnétique H jusqu'à atteindre la valeur $H = g\beta/\Delta E$ qui permet la transition des spins de faible énergie vers les états de haute énergie. L'onde magnétique est alors absorbée : c'est le phénomène de résonance (RPE) (fig. A.7).

Les propriétés magnétiques et électroniques des complexes de fer, dépendent de leur état d'oxydation ainsi que de la nature des ligands. Pour les décrire, la théorie du champ de ligand est la plus utilisée.

Un champ à symétrie octaédrique partage les énergies des cinq orbitales d du fer en deux sous niveaux séparés par une énergie Δ . La plus énergétique, notée e_g , inclut deux orbitales d ,

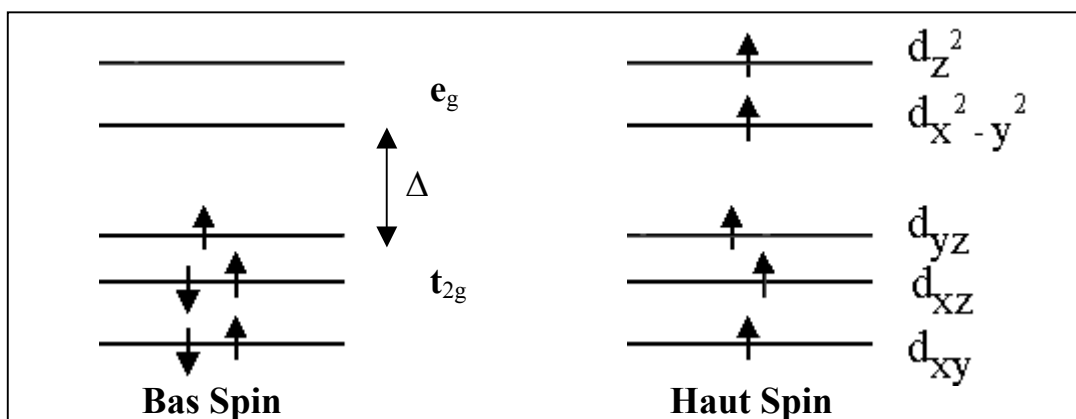


Figure A.8. Représentation de l'occupation des orbitales moléculaires 3d du fer au degré d'oxydation (+3) par ses 5 électrons, suivant les deux états de spin permis : bas spin (BS) et haut spin (HS).

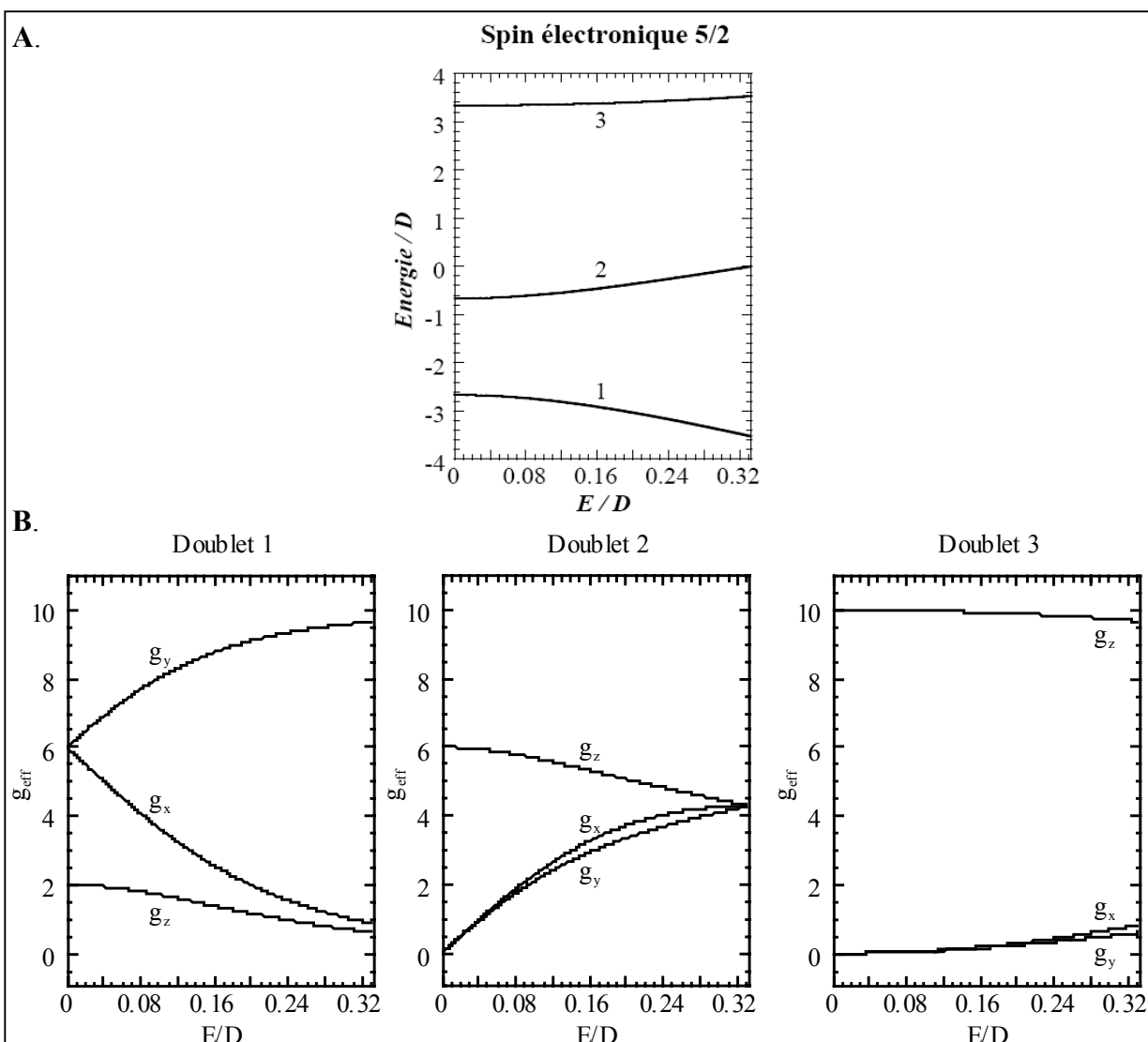


Figure A.9. A. Variation en énergie des trois doublets de Kramer d'un système de spin $S=5/2$ en champ nul en fonction de la rombicité du ZFS (Zero Field Splitting). B. Détail de la séparation des valeurs de g des 3 doublets de Kramer.

$d(x^2-y^2)$ et dz^2 , qui interagissent fortement avec les orbitales des ligands pour former des liaisons de type σ . En raison de leurs orientations spatiales, les trois orbitales d , d_{xy} , d_{yz} , d_{xz} , sont dans un niveau de plus basse énergie, de symétrie t_{2g} et participent principalement à des interactions de type π , avec les orbitales des ligands.

Les configurations électroniques à l'état fondamental des complexes métalliques octaédriques sont obtenues en répartissant les électrons de valence dans les orbitales e_g et t_{2g} (fig. A.8).

Si le champ de ligands est fort, Δ est supérieure à l'énergie d'appariement des électrons et ceux-ci se répartissent dans les sous niveaux de plus faible énergie, donc dans les trois orbitales de symétrie t_{2g} . Le complexe sous forme ferreux ou ferrique est alors dit à spin faible ($S=0$ et $S=1/2$) ou bas spin.

Si le champ de ligands est faible, Δ est inférieure à l'énergie d'appariement des électrons et les électrons de valence se répartissent pour satisfaire à la règle de multiplicité de spin de Hund. Le complexe à l'état ferrique ou ferreux aura alors un spin fort ($S=5/2$ et $S=2$) ou haut spin. Les électrons occuperont les sous niveaux e_g et t_{2g} .

La configuration bas spin (BS), $S=1/2$. Dans le cas des hémoprotéines, elle correspond à celle d'un ion ferrique 6-coordiné. Un seul doublet de Kramer $m_s = \pm 1/2$ est impliqué dans la transition observée. Comme l'électron n'est pas dans une symétrie isotrope, l'interaction du spin électronique avec le champ extérieur donne lieu à trois valeurs de g : g_1 , g_2 et g_3 . La séparation des valeurs de g est déterminée par les valeurs de champ de ligand, un champ tétragonal Δ (lié à la force du champ de ligand selon l'axe z) et un champ rhombique V (lié à la force du champ de ligand selon le plan (x,y) de l'hème). Δ dépend essentiellement de la répartition de la charge sur le fer : plus le ligand est donneur, plus Δ est grand. La rhombicité, évaluée par le rapport V/Δ , est fonction de l'arrangement spatial des ligands.

La configuration haut spin (HS), $S=5/2$. Pour les hémoprotéines, cette configuration correspond à celle d'un hème Fe^{III} 5-coordiné. Les valeurs de m_s possibles sont $\pm 5/2$, $\pm 3/2$ et $\pm 1/2$. Ces six états de spins sont regroupés en trois doublets de Kramer (fig. A.9). Pour une symétrie inférieure à celle de l'octaèdre parfait (ce qui est toujours le cas pour les hémoprotéines), il y a levée de dégénérescence des doublets de Kramer en champ nul (*Zero Field Splitting*, ZFS). Ce ZFS est caractérisé par deux paramètres énergétiques E et D qui correspondent, respectivement, aux paramètres rhombique et axial. Pour un système axial, $E/D = 0$ et on a alors deux valeurs de g à 6 et 2. Plus le système devient rhombique, plus la

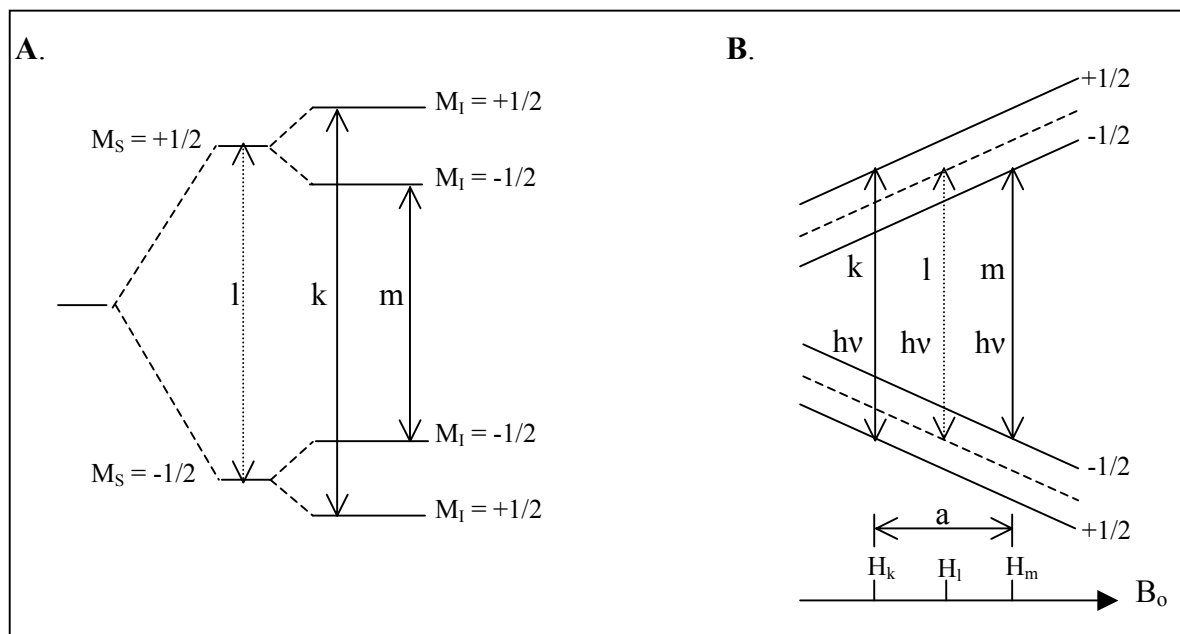


Figure A.10. Représentation des transitions RPE permises au sein d'un système $S=1/2$ en interaction de couplage hyperfin avec un spin nucléaire $I=1/2$ (^1H). Règle de sélection : $\Delta M_S = \pm 1$ et $\Delta M_I = 0$. **A.** Niveaux d'énergie de l'atome d'hydrogène dans un champ magnétique constant. Le trait en pointillé (l) représente la transition Zeeman électronique seule. Les traits continus (k, m) représentent les transitions permises avec le couplage hyperfin : $h\nu = g\beta H \pm \frac{1}{2}hA_o$. A_o (MHz) est la constante de couplage hyperfin isotrope. **B.** Niveaux d'énergie de l'atome d'hydrogène dans un champ magnétique variable (B_0). Sont représentées la transition Zeeman électronique seule (l) et les transitions (k, m) induites par un quantum d'énergie micro-onde $h\nu$ à la même fréquence. Les valeurs de champ résonant sont $H_{m,k} = h\nu/g\beta \pm a/2$, où a (en Gauss) est l'écart hyperfin à fréquence constante, donné par : $H_m - H_k$.

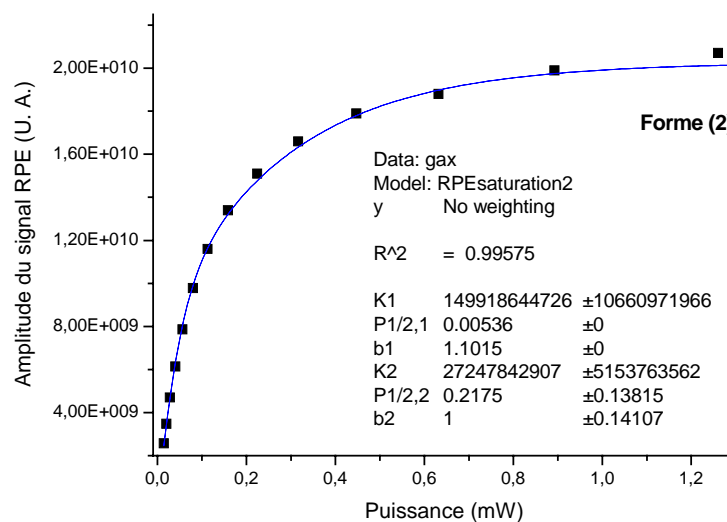
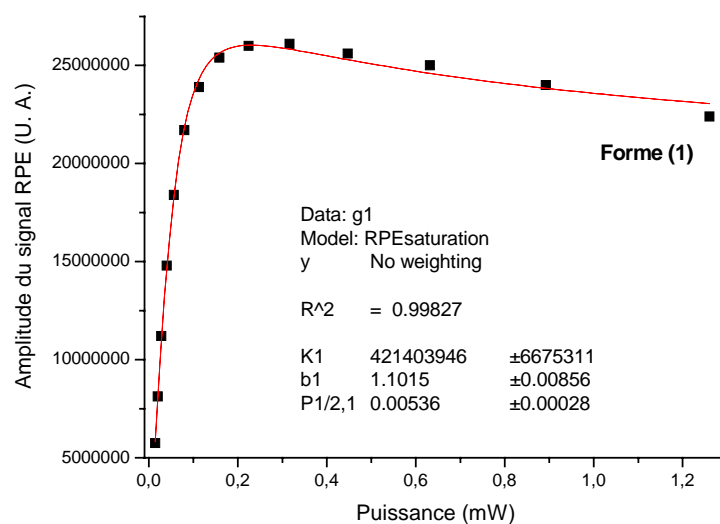
première composante se dédouble pour donner un spectre avec $g_x \neq g_y$ [178] et des valeurs de g proches de 7,6, 4 et 1,8 dans le cas des NOSs [176, 211].

Structure hyperfine et superhyperfine. Lorsque les ions paramagnétiques ont un spin nucléaire I non nul, ce dernier peut interagir avec le spin électronique : c'est le couplage hyperfin. Alors chaque valeur de g du tenseur est éclatée en un nombre $(2I+1)$ de raies, espacées par une constante A qui caractérise la force du couplage. Par exemple le couplage hyperfin entre un spin électronique et le spin nucléaire d'un atome d'hydrogène ($I = 1/2$) va donner un éclatement en deux raies du signal dérivé enregistré en RPE (fig. A.10). Pour un couplage avec le spin nucléaire d'un azote ($I = 1$), un éclatement en trois raies sera observé. En effet, pour qu'une transition soit permise, elle doit satisfaire la règle de sélection : $\Delta M_s = \pm 1$ et $\Delta M_I = 0$.

Le phénomène de couplage superhyperfyn est identique au couplage hyperfin sauf qu'il considère l'interaction entre un spin électronique et le spin nucléaire de noyaux différents. Cependant par abus de langage, quel que soit le noyau avec lequel interagit le spin électronique, on parle souvent de couplage hyperfin.

4.2. Détermination des paramètres de saturation des formes (1) et (2) du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ de iNOSoxy + Arg/+H₄B :

Présentation des courbes de modélisation de l'évolution de l'amplitude du signal RPE en fonction de la puissance (mW).



4.3. Principe de la spectroscopie RPE à impulsions :

Les techniques à impulsions modernes permettent de détecter les fréquences de transitions nucléaires RMN au travers des transitions RPE. Ainsi dans une expérience de type ESEEM (*Electron Spin Echo Envelope Modulation*), les transitions RMN sont observées à cause du mélange respectivement des transitions RPE autorisées et interdites (ou semi-interdites) qui sont excitées de manière cohérente grâce à de courtes (10 ns) mais intenses impulsions micro-ondes. Il en résulte un transfert de cohérence électron-noyau *via* le tenseur anisotrope hyperfin A. De telles techniques sont tout à fait adaptées à la mesure de faibles couplages hyperfins nucléaires c'est-à-dire de l'ordre de la fréquence de Larmor du noyau libre considéré.

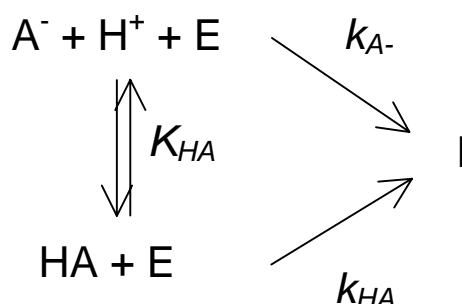
Les développements méthodologiques mis en oeuvre consistent en la mise au point de nouvelles séquences pour améliorer la résolution spectrale mais aussi de recueillir plus d'informations pouvant aider à l'analyse des spectres dans le cas de plusieurs noyaux faiblement couplés à l'électron. Pour ce faire des séquences mettant en oeuvre des transferts de cohérences à multiples quanta sont développées. En effet, dans le cas de plusieurs noyaux faiblement couplés, des séquences telles que l'ESEEM ou HYSCORE (*Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy*) utilisent des impulsions non idéales pour assurer le transfert de cohérence nucléaire ; il en résulte la plupart du temps l'observation de corrélation à simple quantum. L'utilisation d'impulsions idéales calibrées en phase et en durée permet de sélectionner et d'augmenter la détection des chemins de cohérences à double voire à multiple quanta. Il en résulte une bien meilleure résolution que dans un spectre à simple quantum et une attribution facile des signes des constantes de couplages de chacun des noyaux ainsi que l'orientation relative des tenseurs hyperfins.

Le second aspect du développement méthodologique consiste à mettre au point des séquences permettant d'accéder à la mesure de distances entre deux centres paramagnétiques. Les mesures d'ENDOR (*Electron Nuclear Double Resonance*) permettent d'accéder à cette information. Cette méthode qui met en oeuvre une refocalisation du couplage dipolaire entre deux spins électroniques permet d'accéder à l'information de distance et ce pour des centres paramagnétiques distants de plusieurs nanomètres.

5. Elaboration des équations cinétiques :

5.1. Pour la modélisation de k_{obs} avec intervention d'un seul groupe protonable :

Elaboration de l'équation cinétique permettant la modélisation simple de l'évolution de la constante de vitesse k_{obs} de formation de l'intermédiaire (I) en fonction de la valeur du pH, et faisant intervenir un seul groupe protonable HA/A^- :



$$\text{Soit} \quad [HA]_{TOT} = [HA] + [A^-] \quad [1]$$

L'équation de Henderson-Hasselbach s'écrit: $[HA] = \frac{[H^+][A^-]}{K_{HA}}$.

En insérant [1], on obtient :

$$[HA] = \frac{[H^+][HA]_{TOT}}{K_{HA} + [H^+]} \quad [2] \quad \text{et} \quad [A^-] = \frac{K_{HA}}{K_{HA} + 1} [HA]_{TOT} \quad [3].$$

L'équation cinétique de consommation totale du substrat s'écrit:

$$-\frac{\partial [HA]_{TOT}}{\partial t} = k_{HA}[HA] + k_{A^-}[A^-] \quad [4].$$

Si on considère que le transfert de proton n'est pas cinétiquement limitant, alors les équations [1] à [3] sont valables à tout temps. Ainsi en substituant [HA] et [A⁻] par les équations [2] et [3], on obtient:

$$-\frac{\partial [HA]_{TOT}}{\partial t} = \frac{k_{HA}[H^+] + k_{A^-}K_{HA}}{K_{HA} + [H^+]} [HA]_{TOT} \Leftrightarrow -\frac{\partial [HA]_{TOT}}{\partial t} = \frac{k_{HA}[H^+] + k_{A^-}K_{HA}}{K_{HA} + [H^+]} \partial t.$$

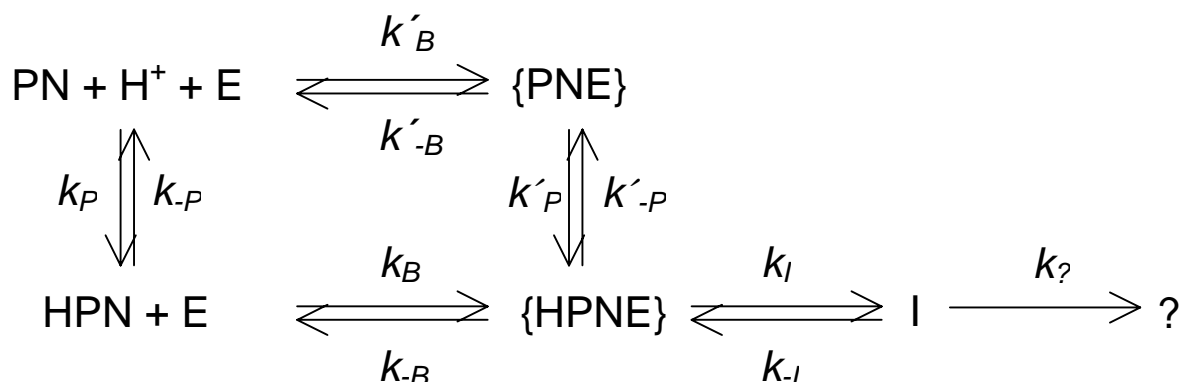
$$\text{L'intégration de cette équation donne:} \quad [HA]_{TOT} = [HA]_{TOT}^0 e^{-\frac{k_{HA}[H^+] + k_{A^-}K_{HA}}{K_{HA} + [H^+]} t}$$

avec k_{obs} , la constante de vitesse observée: $k_{obs} = \frac{k_{HA}[H^+] + k_{A^-}K_{HA}}{K_{HA} + [H^+]}$.

Cette équation donne la courbe de titrage du couple HA/A⁻ de k_{HA} à faible pH à k_{A^-} à haut pH, avec un point d'inflexion à K_{HA} .

5.2. Pour la modélisation de k_{obs} avec intervention de deux groupes protonables :

Elaboration de l'équation (E) pour la modélisation de l'évolution de la constante de vitesse de formation de l'intermédiaire (I) en fonction du pH, observée au cours des expériences de mélanges rapides.



$$[\text{HPN}]_{\text{TOT}} = [\text{HPN}] + [\text{PN}]$$

$$[\text{E}]_{\text{TOT}} = [\text{E}] + [\{\text{HPNE}\}] + [\{\text{PNE}\}] + [\text{I}]$$

avec E, iNOSoxy; PN, ONOO⁻; PNH, ONOOH; {PNE}, ONOO⁻ fixé au fer de iNOSoxy;
 {HPNE}, ONOOH fixé au fer de iNOSoxy

Conditions initiales:

- La formation de (I) à partir de {HPNE} doit être rapide et réversible.
- Puisque la réaction de formation de l'intermédiaire (I) dépend de la concentration en substrat, la fixation de HPN doit être une étape limitante et/ou réversible ce qui justifie une analyse en phase stationnaire sur les espèces {PNE} et {HPNE}.
- Les réactions de transfert de proton sont toujours en équilibre rapide. En effet, ces réactions impliquent des atomes d'oxygène. Or une réaction de transfert de proton entre des atomes d'oxygène est thermodynamiquement favorable en solution quand sa constante de vitesse est limitée par la diffusion [159]. Les constantes de vitesse de déprotonation (k_P et k'_{-P}) sont alors $10^{11-pK_a} \approx 10^4 \text{ s}^{-1}$. Les constantes de vitesse de protonation sont données par $10^{11-pH} \geq 10^2 \text{ s}^{-1}$ à pH 9. Cette valeur est significativement plus rapide que l'échelle de temps de l'expérience.

Phase rapide de formation de l'intermédiaire (I) quelle que soit la valeur du pH.

La stratégie va consister à évaluer le flux des états non liés vers les états liés puis des états liés vers l'intermédiaire (I). L'hypothèse de phase stationnaire sera appliquée sur les états liés.

A tout temps, on a:

$$[PN] = [HPN]10^{pH-pKa(HPN)}$$

$$[HPN]_{TOT} = [HPN] + [PN]$$

$$[HPN] = \frac{[HPN]_{TOT}}{1 + 10^{pH-pKa(HPN)}}$$

$$[\{PNE\}] = [\{HPNE\}]10^{pH-pKa(\{HPNE\})}$$

$$\frac{d([PN] + [HPN])}{dt} = 0$$

Si on applique l'hypothèse d'état stationnaire aux états liés, on obtient:

$$\frac{d([\{PNE\}] + [\{HPNE\}])}{dt} = 0$$

$$0 = k'_B[PN][E] + k_B[HPN][E] + k_{-I}[I] - k'_{-B}[\{PNE\}] - k_{-B}[\{HPNE\}] - k_I[\{HPNE\}]$$

$$0 = (k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} + k_B)[HPN][E] + k_{-I}[I] - (k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I)[\{HPNE\}]$$

$$[\{HPNE\}] = \frac{(k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} + k_B)[HPN][E] + k_{-I}[I]}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I}$$

$$[\{HPNE\}] = \frac{(k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} + k_B)[HPN][E] + k_{-I}([E]_{TOT} - [E])}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I}$$

Si on considère à présent la consommation de E (pour former l'intermédiaire (I)), on obtient:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k'_B[PN][E] - k_B[HPN][E] + k'_{-B}[\{PNE\}] + k_{-B}[\{HPNE\}]$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -(k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} + k_B)[HPN][E] + (k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B})[\{HPNE\}]$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -(k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} + k_B)[HPN][E] +$$

$$(k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B}) \frac{(k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} + k_B)[HPN][E] + k_{-I}([E]_{TOT} - [E])}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[E]}{dt} = & - \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I)(k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} + k_B)[HPN][E]}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I} + \\
& \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B})(k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} + k_B)[HPN][E]}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I} \\
& - \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B})k_{-I}}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I}[E] + \\
& \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B})k_{-I}}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I}[E]_{TOT}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[E]}{dt} = & - \frac{k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} k_{-B} + k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} k_I}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I} [HPN][E] \\
& - \frac{k_B k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_B k_{-B} + k_B k_I}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I} [HPN][E] \\
& + \frac{k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} k_{-B}}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I} [HPN][E] \\
& + \frac{k_B k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_B k_{-B}}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I} [HPN][E] \\
& - \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B})k_{-I}}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I} [E] \\
& + \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B})k_{-I}}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I} [E]_{TOT}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[E]}{dt} = & - \left(\frac{k'_B 10^{pH-pKa(HPN)} k_I + k_B k_I}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I} [HPN] + \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B})k_{-I}}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I} [E] \right) + \\
& \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B})k_{-I}}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I} [E]_{TOT}
\end{aligned}$$

Si on identifie k , k' et $[A]_0$ paramètres de l'équation $\frac{d[A]}{dt} = -(k + k')[A] + k'[A]_0$ dont

l'intégration donne $[A] = \frac{k' + ke^{-(k+k')t}}{k + k'} [A]_0 = \left(\frac{k'}{k + k'} + \frac{ke^{-(k+k')t}}{k + k'} \right) [A]_0$ comme :

$$k = \frac{k'_{-B} 10^{pH-pKa(HPN)} k_I + k_B k_I}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I} [HPN]$$

$$k' = \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B}) k_{-I}}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I}$$

avec $[A]_0 = [E]_{TOT}$, alors l'intégration de $\frac{d[E]}{dt}$ donne:

$$[E] = \left(\frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B}) k_{-I}}{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(HPN)} k_I + k_B k_I) [HPN] + (k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B}) k_{-I}} + \right. \\ \left. \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(HPN)} k_I + k_B k_I) e}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I} \right) [E]_{TOT}$$

Le terme exponentiel qui correspond à la constante de vitesse k_{obs} de formation de l'intermédiaire (I) est alors:

$$k_{Obs} = \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(HPN)} k_I + k_B k_I) [HPN] + (k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B}) k_{-I}}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I}$$

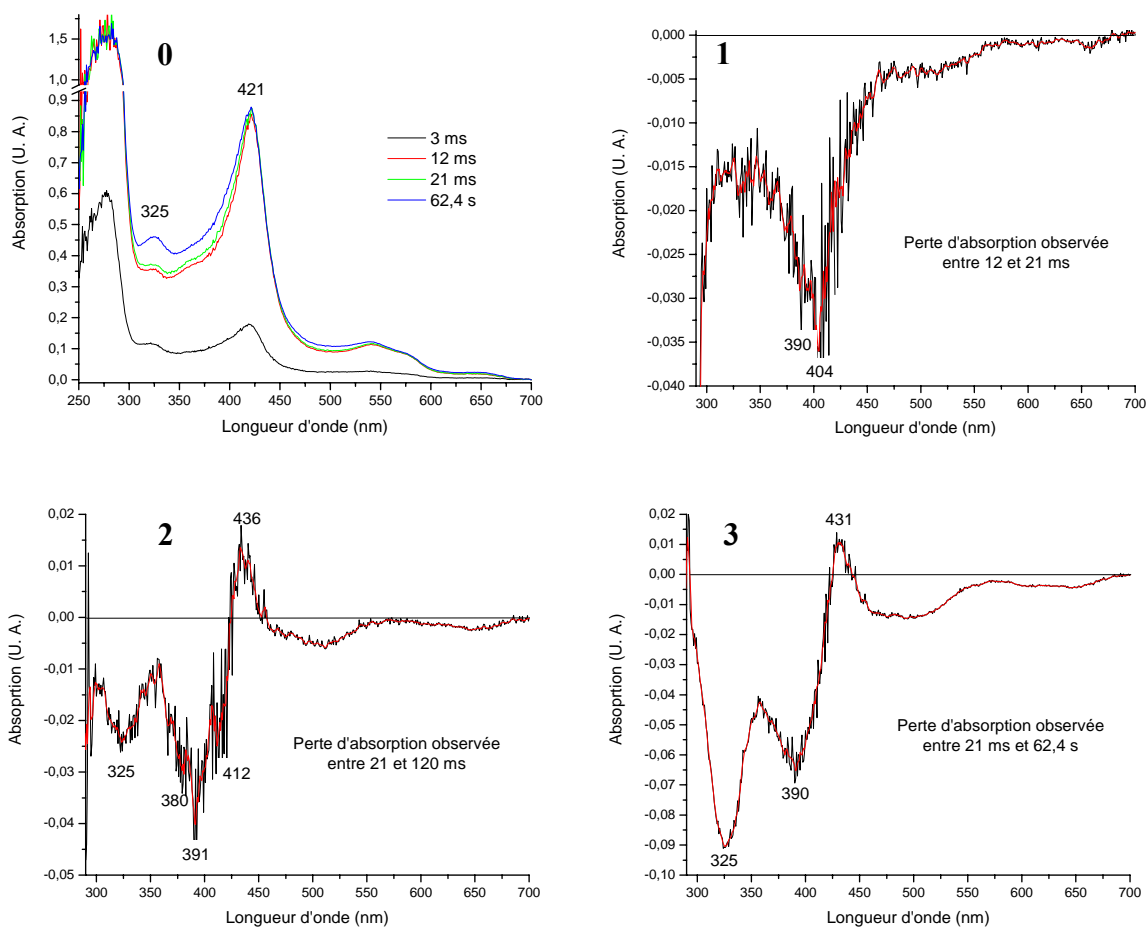
$$k_{Obs} = \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(HPN)} k_I + k_B k_I) \left[\frac{[HPN]_{TOT}}{1 + 10^{pH-pKa(HPN)}} \right] + (k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B}) k_{-I}}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I}$$

$$k_{Obs} = \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(HPN)} k_I + k_B k_I) [HPN]_{TOT}}{(1 + 10^{pH-pKa(HPN)}) (k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I)} + \frac{(k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B}) k_{-I}}{k'_{-B} 10^{pH-pKa(\{HPNE\})} + k_{-B} + k_I}$$

6. Analyse cinétique détaillée de la réaction stoechiométrique entre PN et iNOSoxy :

6.1. A pH 6,5 :

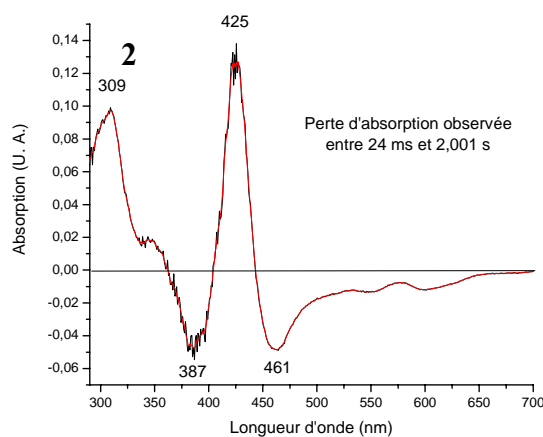
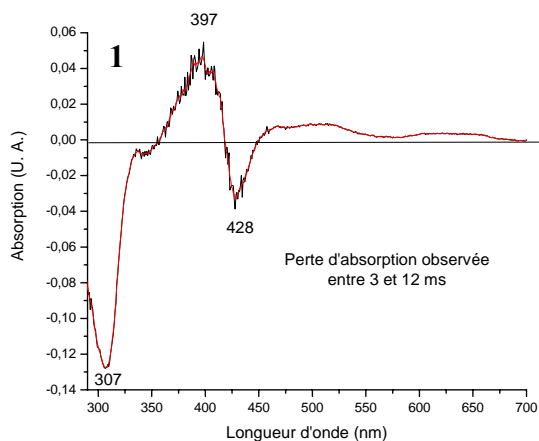
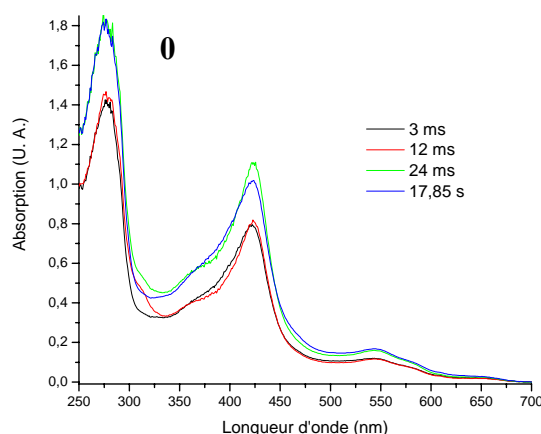
Analyse détaillée des différentes phases observées au cours de l'activation de 60 μM PN par 60 μM iNOSoxy à 4 °C dans KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA à pH 6,5 (en absence de CO_2). **0.** Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 3, 12, 21 ms et 62,4 s de réaction. **1.** Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 21 ms à celui enregistré à 12 ms ; la différence positive d'absorption correspond à l'absorption perdue entre 12 et 21 ms de réaction. **2.** Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 120 ms à celui enregistré à 21 ms. **3.** Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 62,4 s à celui enregistré à 21 ms.

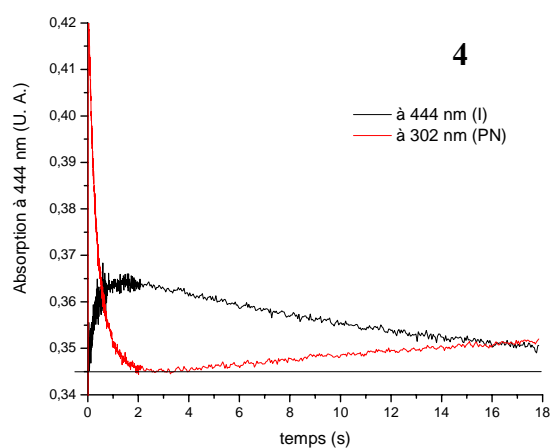
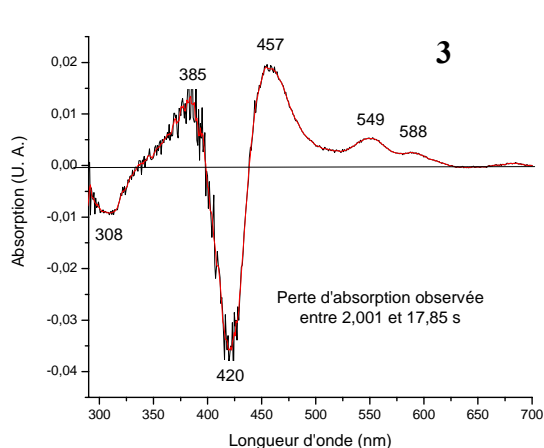


Le spectre enregistré après 3 ms de mélange présente un maximum d'absorption à 419 nm, accompagné d'une autre absorption à 320 nm. Quelques opérations de soustraction de spectres nous permettent d'obtenir des informations sur l'évolution de l'absorption au cours du temps. Ainsi tout au long de la mesure un mélange d'espèces s'accumule avec des maxima d'absorptions relevés à 325 nm et 390 nm. Il semble qu'une augmentation de l'absorption à 650 nm accompagne la formation de ces espèces. La différence des spectres enregistrés à 21 et 120 ms permet d'observer la disparition d'une bande d'absorption autour de 436 nm. Cette absorption pourrait correspondre à l'espèce (I). Cependant le spectre de cette espèce n'a pu être calculé, ni à partir du spectre initial ni à partir du spectre final. Ceci suggère que l'espèce (I) est présente dans ces deux spectres de référence.

6.2. A pH 8,0 :

Analyse détaillée des différentes phases observées au cours de l'activation de 60 μM PN par 60 μM iNOSoxy à 4 °C dans KPi 0,1 M plus 0,3 mM DTPA à pH 8,0 (en absence de CO_2). **0.** Superposition des spectres d'absorption enregistrés après 3, 12, 24 ms et 17,82 s de réaction. **1.** Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 12 ms à celui enregistré à 3 ms ; la différence positive d'absorption correspond à l'absorption perdue entre 3 et 12 ms de réaction. **2.** Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 2,001 s à celui enregistré à 24 ms. **3.** Spectre de différence obtenu par soustraction du spectre enregistré à 17,85 s à celui enregistré à 2,001 s. **4.** Superposition des traces cinétiques enregistrées à 302 nm (PN) et à 444 nm (I).

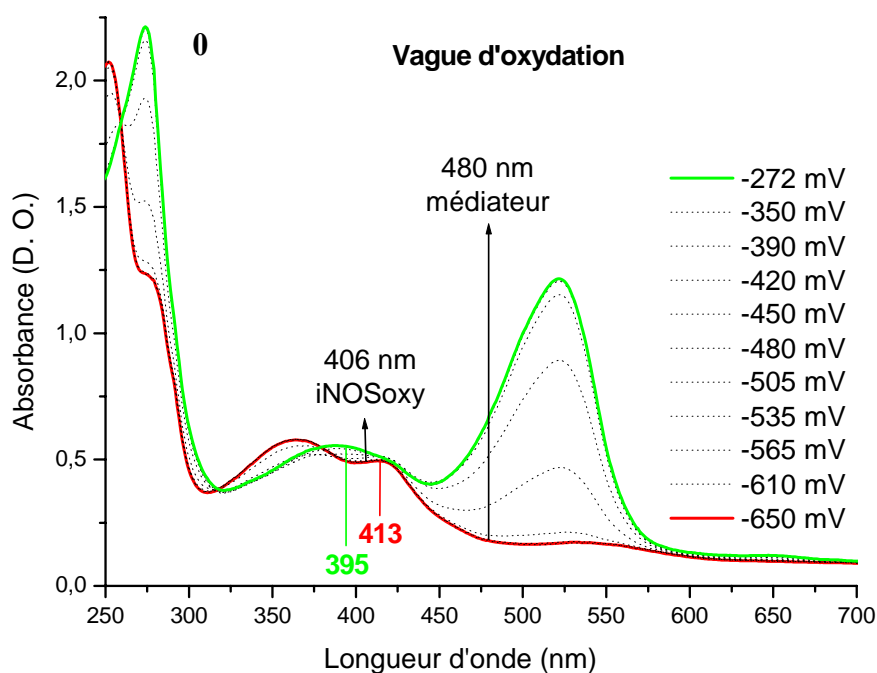


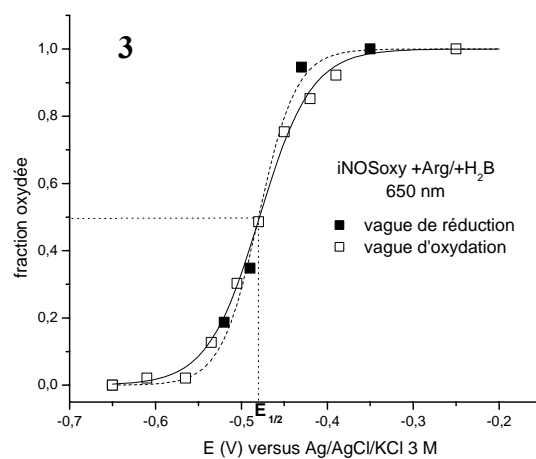
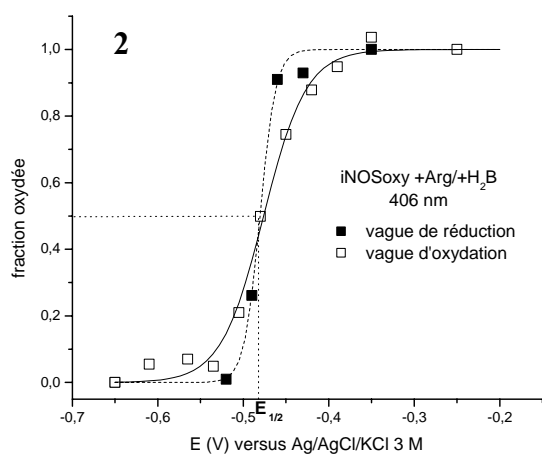
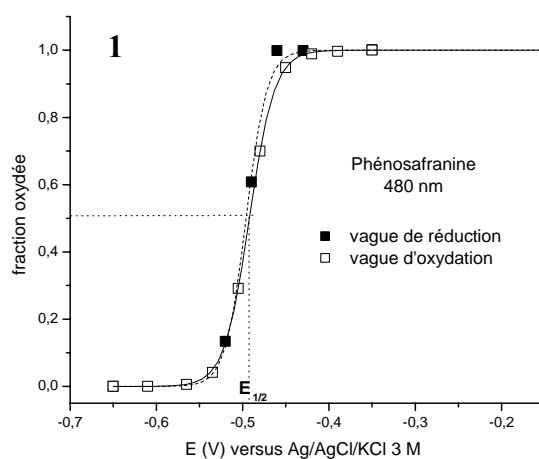


Le spectre initial enregistré à 3 ms présente un maximum d'absorption centré à 422 nm. *A priori* il s'agit donc majoritairement de iNOSoxy native. Entre 3 et 12 ms, une bande d'absorption apparaît à 307 nm. Le spectre de différence calculé entre ces 2 temps indique que l'apparition de cette absorption est accompagnée de la conversion d'une absorption à 397 nm en une autre à 428 nm. Entre 24 ms et 2 s, la formation de l'intermédiaire réactionnel (I) est observée. De 2 à 17,85 s, les espèces (I) et (E) disparaissent au profit de la formation de iNOSoxy native et d'un regain d'absorption à 308 nm.

7. Détermination du potentiel $E_{1/2}$ du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ de iNOSoxy :7.1. iNOSoxy + Arg/+H₂B à pH 8,42 :

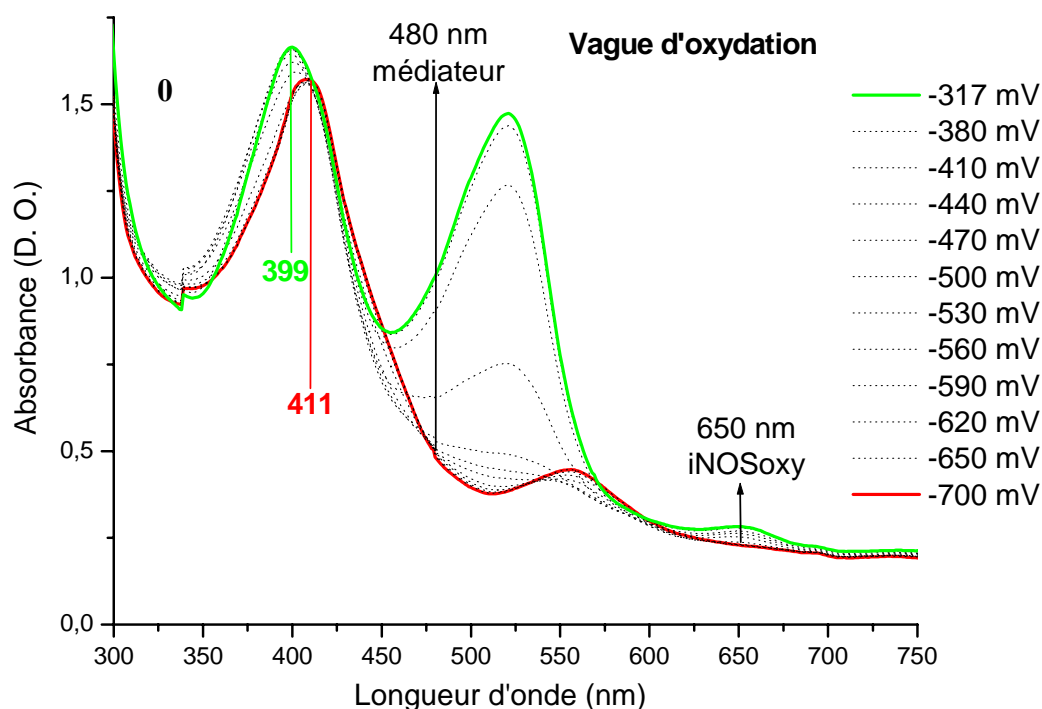
Détermination du potentiel $E_{1/2}$ (mV, vs Ag/AgCl/KCl 3 M) du couple $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ de iNOSoxy (7,2 μM) en conditions saturantes de Arg (5 mM) et H₂B (50 μM) dans KPi 0,1 M plus KCl 0,1 M pH 8,42, en présence de phénosafranine (5 éq. iNOSoxy). **0.** Superposition des spectres d'absorption UV-visible enregistrés à l'équilibre, pour chaque valeur de potentiel appliqué, lors de l'oxydation du complexe Fe^{II} de iNOSoxy + Arg/+H₂B. Le spectre initial de l'espèce Fe^{II} (rouge) présente un maximum d'absorption à 413 nm. Le spectre final (vert) est caractéristique de l'espèce Fe^{III} HS avec un maximum d'absorption à 395 nm. L'évolution de l'absorption représentative de l'oxydation de la protéine est mesurée à 406 et à 650 nm. L'évolution de l'absorption propre à l'oxydation du médiateur est mesurée à 480 nm. Toutes les valeurs d'absorbance sont corrigées par soustraction de l'absorbance mesurée à 820 nm. **1.** Représentation de la fraction de médiateur (phénosafranine) oxydée mesurée à l'équilibre au cours de l'analyse en réduction (■) et en oxydation (□) en fonction du potentiel appliqué. Les résultats sont modélisés à partir de l'équation de Nernst pour déterminer le potentiel $E_{1/2, \text{red}}$ (pointillés) en réduction et $E_{1/2, \text{ox}}$ (trait plein) en oxydation et le nombre n d'électrons échangés au cours de la réaction. Les résultats obtenus pour iNOSoxy + Arg/+H₂B sont traités de la même façon à 406 nm (**2**) et à 650 nm (**3**).

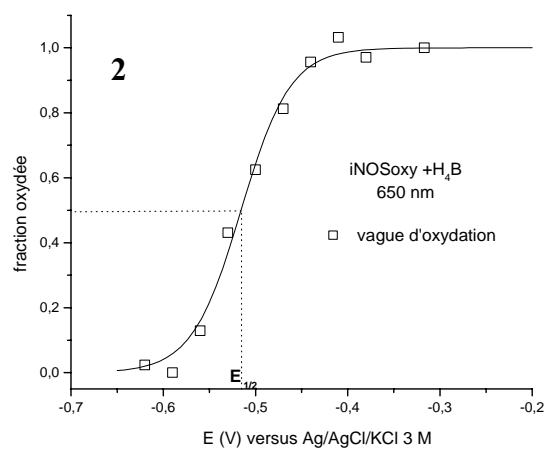
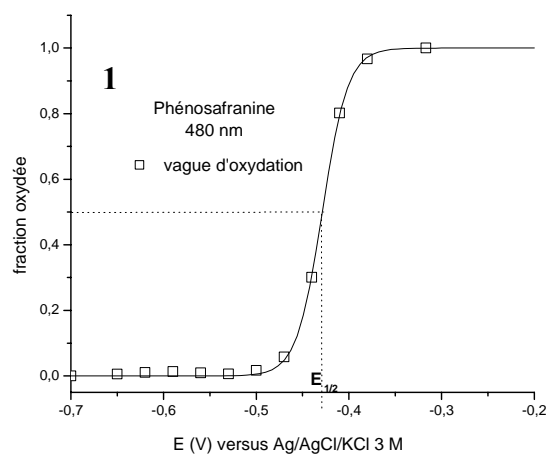




7.2. iNOSoxy +H₄B à pH 6,48 :

Détermination du potentiel $E_{1/2}$ (mV, vs Ag/AgCl/KCl 3 M) du couple Fe^{II}/Fe^{III} de iNOSoxy (7,2 μ M) en condition saturante de H₄B (50 μ M) dans KPi 0,1 M plus KCl 0,1 M pH 6,48, en présence de phénosafranine (1,2 éq. iNOSoxy), de benzylviologène (0,17 éq.) et de méthylviologène (0,07 éq.). **0.** Superposition des spectres d'absorption UV-visible enregistrés à l'équilibre, pour chaque valeur de potentiel appliqué, lors de l'oxydation du complexe Fe^{II} de iNOSoxy +H₄B. Le spectre initial de l'espèce Fe^{II} (rouge) présente un maximum d'absorption à 411 nm. Le spectre final (vert) est caractéristique de l'espèce Fe^{III} HS avec un maximum d'absorption à 399 nm. L'évolution de l'absorption représentative de l'oxydation de la protéine est mesurée à 650 nm. L'évolution de l'absorption propre à l'oxydation du médiateur est mesurée à 480 nm. Toutes les valeurs d'absorbance sont corrigées par soustraction de l'absorbance mesurée à 820 nm. **1.** Représentation de la fraction de médiateur (phénosafranine) oxydée mesurée à l'équilibre au cours de l'analyse en oxydation (\square) en fonction du potentiel appliqué. Les résultats sont modélisés à partir de l'équation de Nernst pour déterminer le potentiel $E_{1/2,ox}$ en oxydation, et le nombre n d'électrons échangés au cours de la réaction. Les résultats obtenus pour iNOSoxy +H₄B sont traités de la même façon à 650 nm (**2**).





Références Bibliographiques

Références bibliographiques.

- [1] Murad F. (1999) Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**(13-14): p. 1857-1868.
- [2] Ignarro L. J., Wood K. S. and Wolin M. S. (1982) Activation of Purified Soluble Guanylate-Cyclase by Protoporphyrin-IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA-Biol. Sci.*, **79**(9): p. 2870-2873.
- [3] Ignarro L. J., Buga G. M., Wood K. S., Byrns R. E. and Chaudhuri G. (1987) Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein Is Nitric-Oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**(24): p. 9265-9269.
- [4] Ignarro L. J. (1999) Nitric oxide: A unique endogenous signaling molecule in vascular biology (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**(13-14): p. 1882-1892.
- [5] Moncada S. and Higgs E. A. (1995) Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies Related to Nitric-Oxide. *Faseb J.*, **9**(13): p. 1319-1330.
- [6] Zhao Y., Brandish P. E., Ballou D. P. and Marletta M. A. (1999) A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**(26): p. 14753-14758.
- [7] Radomski M. W., Palmer R. M. J. and Moncada S. (1987) The Anti-Aggregating Properties of Vascular Endothelium - Interactions between Prostacyclin and Nitric-Oxide. *British Journal of Pharmacology*, **92**(3): p. 639-646.
- [8] Radomski M. W., Palmer R. M. J. and Moncada S. (1987) The Role of Nitric-Oxide and Cgmp in Platelet-Adhesion to Vascular Endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**(3): p. 1482-1489.
- [9] Mungrue I. N. and Bredt D. S. (2004) nNOS at a glance: implications for brain and brawn. *J. Cell Sci.*, **117**(13): p. 2627-2629.
- [10] Duncan A. J. and Heales S. J. (2005) Nitric oxide and neurological disorders. *Mol. Aspects Med.*, **26**(1-2): p. 67-96.
- [11] Holscher C. (1997) Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: Its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci.*, **20**(7): p. 298-303.
- [12] Ignarro L. J. (2002) Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: A historical overview. *J. Physiol. Pharmacol.*, **53**(4): p. 503-514.
- [13] Vallance P. (2003) Nitric oxide: therapeutic opportunities. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **17**(1): p. 1-10.
- [14] Taylor B. S. and Geller D. A. (2000) Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock*, **13**(6): p. 413-424.
- [15] Vila-Del Sol V., Diaz-Munoz M. D. and Fresno M. (2007) Requirement of tumor necrosis factor α and nuclear factor-kappa B in the induction by IFN-gamma of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, **81**(1): p. 272-283.
- [16] Brunori M., Forte E., Arese M., Mastronicola D., Giuffrè A. and Sarti P. (2006) Nitric oxide and the respiratory enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1757**(9-10): p. 1144-1154.
- [17] Borisov V. B., Forte E., Sarti P., Brunori M., Konstantinov A. A. and Giuffrè A. (2006) Nitric oxide reacts with the ferryl-oxo catalytic intermediate of the Cu-B-lacking cytochrome bd terminal oxidase. *Febs Lett.*, **580**(20): p. 4823-4826.
- [18] Fang F. C. (1997) Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.*, **99**(12): p. 2818-2825.
- [19] Saura M., Zaragoza C., McMillan A., Quick R. A., Hohenadl C., Lowenstein J. M. and Lowenstein C. J. (1999) An antiviral mechanism of nitric oxide: Inhibition of a viral protease. *Immunity*, **10**(1): p. 21-28.
- [20] MacMicking J., Xie Q. W. and Nathan C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.*, **15**: p. 323-350.
- [21] Pacher P., Beckman J. S. and Liaudet L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, **87**(1): p. 315-424.

- [22] Miranda K. M., Nims R. W., Thomas D. D., Espey M. G., Citrin D., Bartberger M. D., Paolocci N., Fukuto J. M., Feelisch M. and Wink D. A. (2003) Comparison of the reactivity of nitric oxide and nitroxyl with heme proteins - A chemical discussion of the differential biological effects of these redox related products of NOS. *J. Inorg. Biochem.*, **93**(1-2): p. 52-60.
- [23] Fukuto J. M., Bartberger M. D., Dutton A. S., Paolocci N., Wink D. A. and Houk K. N. (2005) The physiological chemistry and biological activity of nitroxyl (HNO): The neglected, misunderstood, and enigmatic nitrogen oxide. *Chem. Res. Toxicol.*, **18**(5): p. 790-801.
- [24] Stamler J. S., Singel D. J. and Loscalzo J. (1992) Biochemistry of Nitric-Oxide and Its Redox-Activated Forms. *Science*, **258**(5090): p. 1898-1902.
- [25] Miersch S. and Mutus B. (2005) Protein S-nitrosation: Biochemistry and characterization of protein thiol-NO interactions as cellular signals. *Clinical Biochemistry*, **38**(9): p. 777-791.
- [26] Radi R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(12): p. 4003-4008.
- [27] Cassina A. M., Hodara R., Souza J. M., Thomson L., Castro L., Ischiropoulos H., Freeman B. A. and Radi R. (2000) Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.*, **275**(28): p. 21409-21415.
- [28] Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A. and Freeman B. A. (1990) Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite - Implications for Endothelial Injury from Nitric-Oxide and Superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**(4): p. 1620-1624.
- [29] Gryglewski R. J., Palmer R. M. and Moncada S. (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, **320**(6061): p. 454-456.
- [30] Radi R., Peluffo G., Alvarez M. N., Naviliat M. and Cayota A. (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Rad. Biol. & Med.*, **30**(5): p. 463-488.
- [31] Koppenol W. H., Moreno J. J., Pryor W. A., Ischiropoulos H. and Beckman J. S. (1992) Peroxynitrite, a Cloaked Oxidant Formed by Nitric-Oxide and Superoxide. *Chem. Res. Toxicol.*, **5**(6): p. 834-842.
- [32] Szabo C., Ischiropoulos H. and Radi R. (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**(8): p. 662-680.
- [33] Brecht D. S., Hwang P. M. and Snyder S. H. (1990) Localization of Nitric-Oxide Synthase Indicating a Neural Role for Nitric-Oxide. *Nature*, **347**(6295): p. 768-770.
- [34] Brecht D. S. and Snyder S. H. (1990) Isolation of Nitric-Oxide Synthetase, a Calmodulin-Requiring Enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**(2): p. 682-685.
- [35] Brecht D. S., Hwang P. M., Glatt C. E., Lowenstein C., Reed R. R. and Snyder S. H. (1991) Cloned and Expressed Nitric-Oxide Synthase Structurally Resembles Cytochrome-P-450 Reductase. *Nature*, **351**(6329): p. 714-718.
- [36] Wang M., Roberts D. L., Paschke R., Shea T. M., Masters B. S. S. and Kim J. J. P. (1997) Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**(16): p. 8411-8416.
- [37] Adak S., Ghosh S., Abu-Soud H. M. and Stuehr D. J. (1999) Role of reductase domain cluster 1 acidic residues in neuronal nitric-oxide synthase - characterization of the FMN-free enzyme. *J. Biol. Chem.*, **274**(32): p. 22313-22320.

- [38] Narayanasami R., Nishimura J. S., McMillan K., Roman L. J., Shea T. M., Robida A. M., Horowitz P. M. and Masters B. S. S. (1997) The influence of chaotropic reagents on neuronal nitric oxide synthase and its flavoprotein module. Urea and guanidine hydrochloride stimulate NADPH-cytochrome c reductase activity of both proteins. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, **1**(1): p. 39-49.
- [39] Noble M. A., Munro A. W., Rivers S. L., Robledo L., Daff S. N., Yellowlees L. J., Shimizu T., Sagami I., Guillemette J. G. and Chapman S. K. (1999) Potentiometric analysis of the flavin cofactors of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry*, **38**(50): p. 16413-16418.
- [40] Li H. Y. and Poulos T. L. (2005) Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J. Inorg. Biochem.*, **99**(1): p. 293-305.
- [41] Garcin E. D., Bruns C. M., Lloyd S. J., Hosfield D. J., Tiso M., Gachhui R., Stuehr D. J., Tainer J. A. and Getzoff E. D. (2004) Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **279**(36): p. 37918-37927.
- [42] Baek K. J., Thiel B. A., Lucas S. and Stuehr D. J. (1993) Macrophage Nitric-Oxide Synthase Subunits - Purification, Characterization, and Role of Prosthetic Groups and Substrate in Regulating Their Association into a Dimeric Enzyme. *J. Biol. Chem.*, **268**(28): p. 21120-21129.
- [43] Ghosh D. K., AbuSoud H. M. and Stuehr D. J. (1996) Domains of macrophage NO synthase have divergent roles in forming and stabilizing the active dimeric enzyme. *Biochemistry*, **35**(5): p. 1444-1449.
- [44] Klatt P., Pfeiffer S., List B. M., Lehner D., Glatter O., Bachinger H. P., Werner E. R., Schmidt K. and Mayer B. (1996) Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.*, **271**(13): p. 7336-7342.
- [45] Hemmens B., Gorren A. C. F., Schmidt K., Werner E. R. and Mayer B. (1998) Haem insertion, dimerization and reactivation of haem-free rat neuronal nitric oxide synthase. *Biochem. J.*, **332**: p. 337-342.
- [46] Klatt P., Schmidt K., Lehner D., Glatter O., Bachinger H. P. and Mayer B. (1995) Structural-Analysis of Porcine Brain Nitric-Oxide Synthase Reveals a Role for Tetrahydrobiopterin and L-Arginine in the Formation of an Sds-Resistant Dimer. *Embo J.*, **14**(15): p. 3687-3695.
- [47] Panda K., Rosenfeld R. J., Ghosh S., Meade A. L., Getzoff E. D. and Stuehr D. J. (2002) Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *J. Biol. Chem.*, **277**(34): p. 31020-31030.
- [48] Rodriguez-Crespo I., Gerber N. C. and deMontellano P. R. O. (1996) Endothelial nitric-oxide synthase - Expression in Escherichia coli, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation. *J. Biol. Chem.*, **271**(19): p. 11462-11467.
- [49] Venema R. C., Ju H., Zou R., Ryan J. W. and Venema V. J. (1997) Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase - Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J. Biol. Chem.*, **272**(2): p. 1276-1282.
- [50] Li H. Y., Raman C. S., Glaser C. B., Blasko E., Young T. A., Parkinson J. F., Whitlow M. and Poulos T. L. (1999) Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase - Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **274**(30): p. 21276-21284.

- [51] Raman C. S., Li H. Y., Martasek P., Kral V., Masters B. S. S. and Poulos T. L. (1998) Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: A paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell*, **95**(7): p. 939-950.
- [52] Fischmann T. O., Hruza A., Niu X. D., Fossetta J. D., Lunn C. A., Dolphin E., Prongay A. J., Reichert P., Lundell D. J., Narula S. K. and Weber P. C. (1999) Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat. Struct. Biol.*, **6**(3): p. 233-242.
- [53] Crane B. R., Arvai A. S., Ghosh D. K., Wu C. Q., Getzoff E. D., Stuehr D. J. and Tainer J. A. (1998) Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science*, **279**(5359): p. 2121-2126.
- [54] Hemmens B., Goessler W., Schmidt K. and Mayer B. (2000) Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **275**(46): p. 35786-35791.
- [55] Crane B. R., Rosenfeld R. J., Arvai A. S., Ghosh D. K., Ghosh S., Tainer J. A., Stuehr D. J. and Getzoff E. D. (1999) N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization. *Embo J.*, **18**(22): p. 6271-6281.
- [56] Moali C., Boucher J. L., Sari M. A., Stuehr D. J. and Mansuy D. (1998) Substrate specificity of NO synthases: Detailed comparison of L-arginine, homo-L-arginine, their N-omega-hydroxy derivatives, and N-omega-hydroxynor-L-arginine. *Biochemistry*, **37**(29): p. 10453-10460.
- [57] Siddhanta U., Presta A., Fan B. C., Wolan D., Rousseau D. L. and Stuehr D. J. (1998) Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase - Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *J. Biol. Chem.*, **273**(30): p. 18950-18958.
- [58] Lowenstein C. J. and Padalko E. (2004) INOS (NOS2) at a glance. *J. Cell Sci.*, **117**(14): p. 2865-2867.
- [59] Sessa W. C. (2004) eNOS at a glance. *J. Cell Sci.*, **117**(12): p. 2427-2429.
- [60] Roman L. P., Martasek P. and Masters B. S. (2002) Intrinsic and extrinsic modulation of nitric oxide synthase activity. *Chem. Rev.*, **102**(4): p. 1179-1190.
- [61] Cho H. J., Xie Q. W., Calaycay J., Mumford R. A., Swiderek K. M., Lee T. D. and Nathan C. (1992) Calmodulin Is a Subunit of Nitric-Oxide Synthase from Macrophages. *J. Exp. Med.*, **176**(2): p. 599-604.
- [62] Salerno J. C., Harris D. E., Irizarry K., Patel B., Morales A. J., Smith S. M. E., Martasek P., Roman L. J., Masters B. S. S., Jones C. L., Weissman B. A., Lane P., Liu Q. and Gross S. S. (1997) An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **272**(47): p. 29769-29777.
- [63] Nishida C. R. and de Montellano P. R. O. (1998) Electron transfer and catalytic activity of nitric oxide synthases - Chimeric constructs of the neuronal, inducible, and endothelial isoforms. *J. Biol. Chem.*, **273**(10): p. 5566-5571.
- [64] Gorren A. C. F. and Mayer B. (2007) Nitric-oxide synthase: A cytochrome P450 family foster child. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1770**(3): p. 432-445.
- [65] Adak S., Bilwes A. M., Panda K., Hosfield D., Aulak K. S., McDonald J. F., Tainer J. A., Getzoff E. D., Crane B. R. and Stuehr D. J. (2002) Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**(1): p. 107-112.
- [66] Pant K., Bilwes A. M., Adak S., Stuehr D. J. and Crane B. R. (2002) Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, **41**(37): p. 11071-11079.

- [67] Wang Z. Q., Lawson R. J., Buddha M. R., Wei C. C., Crane B. R., Munro A. W. and Stuehr D. J. (2007) Bacterial flavodoxins support nitric oxide production by *Bacillus subtilis* nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **282**(4): p. 2196-2202.
- [68] Adak S., Aulak K. S. and Stuehr D. J. (2002) Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, **277**(18): p. 16167-16171.
- [69] Wang Z. Q., Wei C. C., Sharma M., Pant K., Crane B. R. and Stuehr D. J. (2004) A conserved Val to Ile switch near the heme pocket of animal and bacterial nitric-oxide synthases helps determine their distinct catalytic profiles. *J. Biol. Chem.*, **279**(18): p. 19018-19025.
- [70] Kers J. A., Wach M. J., Krasnoff S. B., Widom J., Cameron K. D., Bukhalid R. A., Gibson D. M., Crane B. R. and Loria R. (2004) Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature*, **429**(6987): p. 79-82.
- [71] Buddha M. R., Keery K. M. and Crane B. R. (2004) An unusual tryptophanyl tRNA synthetase interacts with nitric oxide synthase in *Deinococcus radiodurans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(45): p. 15881-15886.
- [72] Buddha M. R., Tao T., Parry R. J. and Crane B. R. (2004) Regioselective nitration of tryptophan by a complex between bacterial nitric-oxide synthase and tryptophanyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.*, **279**(48): p. 49567-49570.
- [73] Wei C. C., Wang Z. Q., Meade A. L., McDonald J. F. and Stuehr D. J. (2002) Why do nitric oxide synthases use tetrahydrobiopterin? *J. Inorg. Biochem.*, **91**(4): p. 618-624.
- [74] Stuehr D. J., Santolini J., Wang Z. Q., Wei C. C. and Adak S. (2004) Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J. Biol. Chem.*, **279**(35): p. 36167-36170.
- [75] Presta A., Weber-Main A. M., Stankovich M. T. and Stuehr D. J. (1998) Comparative effects of substrates and pterin cofactor on the heme midpoint potential in inducible and neuronal nitric oxide synthases. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**(37): p. 9460-9465.
- [76] Abu-Soud H. M., Ichimori K., Presta A. and Stuehr D. J. (2000) Electron transfer, oxygen binding, and nitric oxide feedback inhibition in endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **275**(23): p. 17349-17357.
- [77] Couture M., Stuehr D. J. and Rousseau D. L. (2000) The ferrous dioxygen complex of the oxygenase domain of neuronal nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **275**(5): p. 3201-3205.
- [78] Abu-Soud H. M., Gachhui R., Raushel F. M. and Stuehr D. J. (1997) The ferrous-dioxy complex of neuronal nitric oxide synthase. Divergent effects of L-arginine and tetrahydrobiopterin on its stability. *J. Biol. Chem.*, **272**(28): p. 17349-17353.
- [79] Bec N., Gorren A. C. F., Voelker C., Mayer B. and Lange R. (1998) Reaction of neuronal nitric-oxide synthase with oxygen at low temperature - Evidence for reductive activation of the oxy-ferrous complex by tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.*, **273**(22): p. 13502-13508.
- [80] Gorren A. C. F., Bec N., Schrammel A., Werner E. R., Lange R. and Mayer B. (2000) Low-temperature optical absorption spectra suggest a redox role for tetrahydrobiopterin in both steps of nitric oxide synthase catalysis. *Biochemistry*, **39**(38): p. 11763-11770.
- [81] Schmidt P. P., Lange R., Gorren A. C. F., Werner E. R., Mayer B. and Andersson K. K. (2001) Formation of a protonated trihydrobiopterin radical cation in the first reaction cycle of neuronal and endothelial nitric oxide synthase detected by electron paramagnetic: Resonance spectroscopy. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6**(2): p. 151-158.

- [82] Hurshman A. R. and Marletta M. A. (2002) Reactions catalyzed by the heme domain of inducible nitric oxide synthase: Evidence for the involvement of tetrahydrobiopterin in electron transfer. *Biochemistry*, **41**(10): p. 3439-3456.
- [83] Davydov R., Ledbetter-Rogers A., Martasek P., Larukhin M., Sono M., Dawson J. H., Masters B. S. S. and Hoffman B. M. (2002) EPR and ENDOR characterization of intermediates in the cryoreduced oxy-nitric oxide synthase heme domain with bound L-arginine or N-G-hydroxyarginine. *Biochemistry*, **41**(33): p. 10375-10381.
- [84] Meunier B., de Visser S. P. and Shaik S. (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.*, **104**(9): p. 3947-3980.
- [85] Stuehr D. J. (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1411**(2-3): p. 217-230.
- [86] Li H. Y., Raman C. S., Martasek P., Masters B. S. S. and Poulos T. L. (2001) Crystallographic studies on endothelial nitric oxide synthase complexed with nitric oxide and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry*, **40**(18): p. 5399-5406.
- [87] Sorlie M., Gorren A. C. F., Marchal S., Shimizu T., Lange R., Andersson K. K. and Mayer B. (2003) Single-turnover of nitric-oxide synthase in the presence of 4-amino-tetrahydrobiopterin - Proposed role for tetrahydrobiopterin as a proton donor. *J. Biol. Chem.*, **278**(49): p. 48602-48610.
- [88] Moreau M., Boucher J. L., Mattioli T. A., Stuehr D. J., Mansuy D. and Santolini J. (2006) Differential effects of alkyl- and arylguanidines on the stability and reactivity of inducible NOS heme-dioxygen complexes. *Biochemistry*, **45**(12): p. 3988-3999.
- [89] Pant K. and Crane B. R. (2006) Nitrosyl-heme structures of *Bacillus subtilis* nitric oxide synthase have implications for understanding substrate oxidation. *Biochemistry*, **45**(8): p. 2537-2544.
- [90] Alderton W. K., Cooper C. E. and Knowles R. G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, **357**: p. 593-615.
- [91] Hurshman A. R., Krebs C., Edmondson D. E. and Marletta M. A. (2003) Ability of tetrahydrobiopterin analogues to support catalysis by inducible nitric oxide synthase: Formation of a pterin radical is required for enzyme activity. *Biochemistry*, **42**(45): p. 13287-13303.
- [92] Wei C. C., Crane B. R. and Stuehr D. J. (2003) Tetrahydrobiopterin radical enzymology. *Chem. Rev.*, **103**(6): p. 2365-2383.
- [93] Knowles R. G. and Moncada S. (1994) Nitric-Oxide Synthases in Mammals. *Biochem. J.*, **298**: p. 249-258.
- [94] Negrerie M., Berka V., Vos M. H., Liebl U., Lambry J. C., Tsai A. L. and Martin J. L. (1999) Geminate recombination of nitric oxide to endothelial nitric-oxide synthase and mechanistic implications. *J. Biol. Chem.*, **274**(35): p. 24694-24702.
- [95] Wei C. C., Wang Z. Q., Hemann C., Hille R. and Stuehr D. J. (2003) A tetrahydrobiopterin radical forms and then becomes reduced during N-omega-hydroxyarginine oxidation by nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **278**(47): p. 46668-46673.
- [96] Santolini J., Adak S., Curran C. M. L. and Stuehr D. J. (2001) A kinetic simulation model that describes catalysis and regulation in nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **276**(2): p. 1233-1243.
- [97] Santolini J., Meade A. L. and Stuehr D. J. (2001) Differences in three kinetic parameters underpin the unique catalytic profiles of nitric-oxide synthases I, II, and III. *J. Biol. Chem.*, **276**(52): p. 48887-48898.
- [98] GarciaCardena G., Martasek P., Masters B. S. S., Skidd P. M., Couet J., Li S. W., Lisanti M. P. and Sessa W. C. (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide

- synthase (NOS) and caveolin - Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.*, **272**(41): p. 25437-25440.
- [99] Garcia-Cardena G., Fan R., Shah V., Sorrentino R., Cirino G., Papapetropoulos A. and Sessa W. C. (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, **392**(6678): p. 821-824.
- [100] Ratovitski E. A., Alam M. R., Quick R. K., McMillan A., Bao C., Kozlovsky C., Hand T. A., Johnson R. C., Mains R. E., Eipper B. A. and Lowenstein C. J. (1999) Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **274**(2): p. 993-999.
- [101] Feron O., Belhassen L., Kobzik L., Smith T. W., Kelly R. A. and Michel T. (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae - Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **271**(37): p. 22810-22814.
- [102] Sato Y., Sagami I. and Shimizu T. (2004) Identification of caveolin-1-interacting sites in neuronal nitric-oxide synthase - Molecular mechanism for inhibition of NO formation. *J. Biol. Chem.*, **279**(10): p. 8827-8836.
- [103] Adak S., Santolini J., Tikunova S., Wang Q., Johnson J. D. and Stuehr D. J. (2001) Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 -> Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis. *J. Biol. Chem.*, **276**(2): p. 1244-1252.
- [104] Fulton D., Gratton J. P., McCabe T. J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T. F., Papapetropoulos A. and Sessa W. C. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, **399**(6736): p. 597-601.
- [105] McCabe T. J., Fulton D., Roman L. J. and Sessa W. C. (2000) Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **275**(9): p. 6123-6128.
- [106] Hurshman A. R. and Marletta M. A. (1995) Nitric-Oxide Complexes of Inducible Nitric-Oxide Synthase - Spectral Characterization and Effect on Catalytic Activity. *Biochemistry*, **34**(16): p. 5627-5634.
- [107] Abu-Soud H. M., Ichimori K., Nakazawa H. and Stuehr D. J. (2001) Regulation of inducible nitric oxide synthase by self-generated NO. *Biochemistry*, **40**(23): p. 6876-6881.
- [108] Abu-Soud H. M., Wang J., Rousseau D. L., Fukuto J. M., Ignarro L. J. and Stuehr D. J. (1995) Neuronal Nitric Oxide Synthase Self-inactivates by Forming a Ferrous-Nitrosyl Complex during Aerobic Catalysis. *J. Biol. Chem.*, **270**(39): p. 22997-23006.
- [109] Scheele J. S., Bruner E., Kharitonov V. G., Martasek P., Roman L. J., Masters B. S. S., Sharma V. S. and Magde D. (1999) Kinetics of NO ligation with nitric-oxide synthase by flash photolysis and stopped-flow spectrophotometry. *J. Biol. Chem.*, **274**(19): p. 13105-13110.
- [110] Adak S., Crooks C., Wang Q., Crane B. R., Tainer J. A., Getzoff E. D. and Stuehr D. J. (1999) Tryptophan 409 controls the activity of neuronal nitric-oxide synthase by regulating nitric oxide feedback inhibition. *J. Biol. Chem.*, **274**(38): p. 26907-26911.
- [111] Miller R. T., Martasek P., Roman L. J., Nishimura J. S. and Masters B. S. S. (1997) Involvement of the reductase domain of neuronal nitric oxide synthase in superoxide anion production. *Biochemistry*, **36**(49): p. 15277-15284.
- [112] Heinzl B., John M., Klatt P., Bohme E. and Mayer B. (1992) Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Formation of Hydrogen-Peroxide by Brain Nitric-Oxide Synthase. *Biochem. J.*, **281**(Pt3): p. 627-630.
- [113] Vasquez-Vivar J. and Kalyanaraman B. (2000) Generation of superoxide from nitric oxide synthase. *Febs Lett.*, **481**(3): p. 305-306.

- [114] Halliwell B., Zhao K. and Whiteman M. (1999) Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic. Res.*, **31**(6): p. 651-669.
- [115] Patel R. P., McAndrew J., Sellak H., White C. R., Jo H. J., Freeman B. A. and Darley-Usmar V. M. (1999) Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1411**(2-3): p. 385-400.
- [116] Tejero J., Santolini J. and Stuehr D. J. (soumis) Regulation of ferrous Heme-NO oxidation in nitric oxide synthases. *J. Biol. Chem.*
- [117] Herold S. (1999) Kinetic and spectroscopic characterization of an intermediate peroxynitrite complex in the nitrogen monoxide induced oxidation of oxyhemoglobin (vol 439, pg 85, 1998). *Febs Lett.*, **443**(1): p. 80-84.
- [118] Pufahl R. A., Wishnok J. S. and Marletta M. A. (1995) Hydrogen Peroxide-Supported Oxidation of N-G-Hydroxy-L-Arginine by Nitric-Oxide Synthase. *Biochemistry*, **34**(6): p. 1930-1941.
- [119] Sennequier N. and Stuehr D. J. (1996) Analysis of substrate-induced electronic, catalytic, and structural changes in inducible NO synthase. *Biochemistry*, **35**(18): p. 5883-5892.
- [120] Murphy M. E. and Noack E. (1994) *Nitric-Oxide Assay Using Hemoglobin Method*, Oxygen Radicals in Biological Systems, in *Methods in Enzymology*, Vol. 233, p. 240-250.
- [121] Pfeiffer S., Gorren A. C. F., Schmidt K., Werner E. R., Hansert B., Bohle D. S. and Mayer B. (1997) Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution - Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *J. Biol. Chem.*, **272**(6): p. 3465-3470.
- [122] Milstien S. and Katusic Z. (1999) Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: Implications for vascular endothelial function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**(3): p. 681-684.
- [123] Laursen J. B., Somers M., Kurz S., McCann L., Warnholtz A., Freeman B. A., Tarpey M., Fukai T. and Harrison D. G. (2001) Endothelial regulation of vasomotion in ApoE-deficient mice - Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*, **103**(9): p. 1282-1288.
- [124] Wu G. Y. and Brosnan J. T. (1992) Macrophages Can Convert Citrulline into Arginine. *Biochem. J.*, **281**: p. 45-48.
- [125] Verdon C. P., Burton B. A. and Prior R. L. (1995) Sample Pretreatment with Nitrate Reductase and Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase Quantitatively Reduces Nitrate While Avoiding Interference by NADP(+) When the Griess Reaction Is Used to Assay for Nitrite. *Anal. Biochem.*, **224**(2): p. 502-508.
- [126] Tsai H. H., Hamilton T. P., Tsai J. H. M., vanderWoerd M., Harrison J. G., Jablonsky M. J., Beckman J. S. and Koppenol W. H. (1996) Ab initio and NMR study of peroxynitrite and peroxynitrous acid: Important biological oxidants. *J. Phys. Chem.*, **100**(37): p. 15087-15095.
- [127] Padmaja S., Kissner R., Bounds P. L. and Koppenol W. H. (1998) Hydrogen isotope effect on the isomerization of peroxynitrous acid. *Helvetica Chimica Acta*, **81**(7): p. 1201-1206.
- [128] Merenyi G. and Lind J. (1997) Thermodynamics of peroxynitrite and its CO₂ adduct. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**(11): p. 1216-1220.
- [129] Merenyi G., Lind J., Czapski G. and Goldstein S. (2000) The decomposition of peroxynitrite does not yield nitroxyl anion and singlet oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(15): p. 8216-8218.

- [130] Lymar S. V., Khairutdinov R. F. and Hurst J. K. (2003) Hydroxyl radical formation by O-O bond homolysis in peroxyxynitrous acid. *Inorg. Chem.*, **42**(17): p. 5259-5266.
- [131] Kissner R., Nauser T., Bugnon P., Lye P. G. and Koppenol W. H. (1997) Formation and properties of peroxyxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**(11): p. 1285-1292.
- [132] Logager T. and Sehested K. (1993) Formation and Decay of Peroxyxynitrous Acid - a Pulse-Radiolysis Study. *J. Phys. Chem.*, **97**(25): p. 6664-6669.
- [133] Radi R., Beckman J. S., Bush K. M. and Freeman B. A. (1991) Peroxyxynitrite Oxidation of Sulfhydryls - the Cytotoxic Potential of Superoxide and Nitric-Oxide. *J. Biol. Chem.*, **266**(7): p. 4244-4250.
- [134] Meli R., Nauser T., Latal P. and Koppenol W. H. (2002) Reaction of peroxyxynitrite with carbon dioxide: intermediates and determination of the yield of CO₃ center dot and NO₂ center dot. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**(1-2): p. 31-36.
- [135] Lymar S. V. and Hurst J. K. (1995) Rapid Reaction between Peroxynitrite Ion and Carbon-Dioxide - Implications for Biological-Activity. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**(34): p. 8867-8868.
- [136] Ferrer-Sueta G., Vitturi D., Batinic-Haberle I., Fridovich I., Goldstein S., Czapski G. and Radi R. (2003) Reactions of manganese Porphyrins with peroxyxynitrite and carbonate radical anion. *J. Biol. Chem.*, **278**(30): p. 27432-27438.
- [137] Lee J., Hunt J. A. and Groves J. T. (1998) Manganese Porphyrins as Redox-Coupled Peroxyxynitrite Reductases. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**(24): p. 6053-6061.
- [138] Lee J., Hunt J. A. and Groves J. T. (1998) Mechanisms of Iron Porphyrin Reactions with Peroxyxynitrite. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**(30): p. 7493-7501.
- [139] Crow J. P. (1999) Manganese and iron porphyrins catalyze peroxyxynitrite decomposition and simultaneously increase nitration and oxidant yield: Implications for their use as peroxyxynitrite scavengers in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.*, **371**(1): p. 41-52.
- [140] Floris R., Piersma S. R., Yang G., Jones P. and Wever R. (1993) Interaction of Myeloperoxidase with Peroxyxynitrite - a Comparison with Lactoperoxidase, Horseradish-Peroxidase and Catalase. *Eur. J. Biochem.*, **215**(3): p. 767-775.
- [141] Herold S. and Shivashankar K. (2003) Metmyoglobin and methemoglobin catalyze the isomerization of peroxyxynitrite to nitrate. *Biochemistry*, **42**(47): p. 14036-14046.
- [142] Herold S. and Fago A. (2005) Reactions of peroxyxynitrite with globin proteins and their possible physiological role. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. & Integr. Physiol.*, **142**(2): p. 124-129.
- [143] Herold S. and Koppenol W. H. (2005) Peroxyxynitritometal complexes. *Coord. Chem. Rev.*, **249**(3-4): p. 499-506.
- [144] Daiber A., Herold S., Schoneich C., Namgaladze D., Peterson J. A. and Ullrich V. (2000) Nitration and inactivation of cytochrome P450(BM-3) by peroxyxynitrite - Stopped-flow measurements prove ferryl intermediates. *Eur. J. Biochem.*, **267**(23): p. 6729-6739.
- [145] Mehl M., Daiber A., Herold S., Shoun H. and Ullrich V. (1999) Peroxyxynitrite reaction with heme proteins. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, **3**(2): p. 142-152.
- [146] Zou M. H., Martin C. and Ullrich V. (1997) Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxyxynitrite. *Biol. Chem.*, **378**(7): p. 707-713.
- [147] Daiber A., Schoneich C., Schmidt P., Jung C. and Ullrich V. (2000) Autocatalytic nitration of P450(CAM) by peroxyxynitrite. *J. Inorg. Biochem.*, **81**(3): p. 213-220.

- [148] Ischiropoulos H., Nelson J., Duran D. and AlMehdi A. (1996) Reactions of nitric oxide and peroxynitrite with organic molecules and ferrihorseradish peroxidase: Interference with the determination of hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. & Med.*, **20**(3): p. 373-381.
- [149] Lyman S. V. and Hurst J. K. (1996) Carbon dioxide: Physiological catalyst for peroxynitrite-mediated cellular damage or cellular protectant? *Chem. Res. Toxicol.*, **9**(5): p. 845-850.
- [150] Kuzkaya N., Weissmann N., Harrison D. G. and Dikalov S. (2003) Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols - Implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **278**(25): p. 22546-22554.
- [151] Behan R. K., Hoffart L. M., Stone K. L., Krebs C. and Green M. T. (2007) Reaction of cytochrome P450(BM3) and peroxynitrite yields nitrosyl complex. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**(18): p. 5855-5859.
- [152] Crow J. P. (2000) Peroxynitrite scavenging by metalloporphyrins and thiolates. *Free Rad. Biol. & Med.*, **28**(10): p. 1487-1494.
- [153] Green M. T., Dawson J. H. and Gray H. B. (2004) Oxoiron(IV) in chloroperoxidase compound II is basic: implications for P450 chemistry. *Science*, **304**(5677): p. 1653-1656.
- [154] Stone K. L., Behan R. K. and Green M. T. (2006) Resonance Raman spectroscopy of chloroperoxidase compound II provides direct evidence for the existence of an iron(IV)-hydroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**(33): p. 12307-12310.
- [155] Green M. T. (2006) Application of Badger's rule to heme and non-heme iron-oxygen bonds: an examination of ferryl protonation states. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**(6): p. 1902-1906.
- [156] Behan R. K., Hoffart L. M., Stone K. L., Krebs C. and Green M. T. (2006) Evidence for basic ferryls in cytochromes P450. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**(35): p. 11471-11474.
- [157] Solar S., Getoff N., Surdhar P. S., Armstrong D. A. and A. Singh (1995) Oxidation of tryptophan and N-methylindole by N_3^- , Br_2^- , and $(SCN)_2^-$ radicals in light- and heavy-water solutions: a pulse radiolysis study. *J. Phys. Chem.*, **95**(9): p. 3639-3643.
- [158] Herold S., Exner M. and Nauser T. (2001) Kinetic and mechanistic studies of the NO center dot-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. *Biochemistry*, **40**(11): p. 3385-3395.
- [159] Bell R. P. (1973) The proton in Chemistry, Ed. Cornell University Press.
- [160] Jensen M. P. and Riley D. P. (2002) Peroxynitrite decomposition activity of iron porphyrin complexes. *Inorg. Chem.*, **41**(18): p. 4788-4797.
- [161] Goldstein S., Lind J. and Merenyi G. (2005) Chemistry of peroxynitrites as compared to peroxynitrates. *Chem. Rev.*, **105**(6): p. 2457-2470.
- [162] Palcic M. M., Rutter R., Araiso T., Hager L. P. and Dunford H. B. (1980) Spectrum of Chloroperoxidase Compound-I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94**(4): p. 1123-1127.
- [163] Nakajima R., Yamazaki I. and Griffin B. W. (1985) Spectra of Chloroperoxidase Compound-II and Compound-III. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **128**(1): p. 1-6.
- [164] Trostchansky A., O'Donnell V. B., Goodwin D. C., Landino L. M., Marnett L. J., Radi R. and Rubbo H. (2007) Interactions between nitric oxide and peroxynitrite during prostaglandin endoperoxide H synthase-1 catalysis: A free radical mechanism of inactivation. *Free Rad. Biol. & Med.*, **42**(7): p. 1029-1038.
- [165] Spolitak T., Dawson J. H. and Ballou D. P. (2005) Reaction of ferric cytochrome P450cam with peracids - Kinetic characterization of intermediates on the reaction pathway. *J. Biol. Chem.*, **280**(21): p. 20300-20309.

- [166] Jung C., Schunemann V., Lendzian F., Trautwein A. X., Contzen J., Galander M., Bottger L. H., Richter M. and Barra A. L. (2005) Spectroscopic characterization of the iron-oxo intermediate in cytochrome P450. *Biol. Chem.*, **386**(10): p. 1043-1053.
- [167] Jung C., Schunemann V. and Lendzian F. (2005) Freeze-quenched iron-oxo intermediates in cytochromes P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**(1): p. 355-364.
- [168] Gorren A. C. F., Schrammel A., Schmidt K. and Mayer B. (1998) Effects of pH on the structure and function of neuronal nitric oxide synthase. *Biochem. J.*, **331**(Pt3): p. 801-807.
- [169] Zou M. H., Daiber A., Peterson J. A., Shoun H. and Ullrich V. (2000) Rapid reactions of peroxynitrite with heme-thiolate proteins as the basis for protection of prostacyclin synthase from inactivation by nitration. *Arch. Biochem. Biophys.*, **376**(1): p. 149-155.
- [170] Herold S., Boccini F. and Kalinga S. (2004) Interaction of peroxynitrite with hemoglobin and myoglobin. *Free Rad. Biol. & Med.*, **36**: p. S3-S4.
- [171] Daiber A., Bachschmid M., Beckman J. S., Munzel T. and Ullrich V. (2004) The impact of metal catalysis on protein tyrosine nitration by peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**(3): p. 873-881.
- [172] Soum E., Brazzolotto X., Goussias C., Bouton C., Moulis J. M., Mattioli T. A. and Drapier J. C. (2003) Peroxynitrite and nitric oxide differently target the iron-sulfur cluster and amino acid residues of human iron regulatory protein 1. *Biochemistry*, **42**(25): p. 7648-7654.
- [173] Quaroni L. and Smith W. E. (1999) Nitration of internal tyrosine of cytochrome c probed by resonance Raman scattering. *Biospectroscopy*, **5**(5): p. S71-S76.
- [174] Quaroni L. G., Seward H. E., McLean K. J., Girvan H. M., Ost T. W. B., Noble M. A., Kelly S. M., Price N. C., Cheesman M. R., Smith W. E. and Munro A. W. (2004) Interaction of nitric oxide with cytochrome P450BM3. *Biochemistry*, **43**(51): p. 16416-16431.
- [175] Herold S., Kalinga S., Matsui T. and Watanabe Y. (2004) Mechanistic studies of the isomerization of peroxynitrite to nitrate catalyzed by distal histidine metmyoglobin mutants. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**(22): p. 6945-6955.
- [176] Salerno J. C., Martasek P., Roman L. J. and Masters B. S. S. (1996) Electron paramagnetic resonance spectroscopy of the heme domain of inducible nitric oxide synthase: Binding of ligands at the arginine site induces changes in the heme ligation geometry. *Biochemistry*, **35**(24): p. 7626-7630.
- [177] Peisach J. and Blumberg W. E. (1970) Electron Paramagnetic Resonance Study of High-Spin and Low-Spin Forms of Cytochrome P-450 in Liver and in Liver Microsomes from a Methycholanthrene-Treated Rabbit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**(1): p. 172-179.
- [178] Peisach J., Blumberg W. E., Ogawa S., Rachmile.Ea and Oltzik R. (1971) Effects of Protein Conformation on Heme Symmetry in High Spin Ferric Heme Proteins as Studied by Electron Paramagnetic Resonance. *J. Biol. Chem.*, **246**(10): p. 3342-3355.
- [179] Ost T. W. B. and Daff S. (2005) Thermodynamic and kinetic analysis of the nitrosyl, carbonyl, and dioxy heme complexes of neuronal nitric-oxide synthase - The roles of substrate and tetrahydrobiopterin in oxygen activation. *J. Biol. Chem.*, **280**(2): p. 965-973.
- [180] Udit A. K., Belliston-Bittner W., Glazer E. C., Le Nguyen Y. H., Gillan J. M., Hill M. G., Marletta M. A., Goodin D. B. and Gray H. B. (2005) Redox couples of inducible nitric oxide synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**(32): p. 11212-11213.

- [181] Bayachou M. and Boutros J. A. (2004) Direct electron transfer to the oxygenase domain of neuronal nitric oxide synthase (NOS): Exploring unique redox properties of NOS enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**(40): p. 12722-12723.
- [182] Brown D. J. (1998) The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Ed. D. Brown, Ed. Vol. 24, New York: John Wiley and Sons.
- [183] Gogonea V., Shy J. M. 2nd and Biswas P. K. (2006) Electronic structure, ionization potential, and electron affinity of the enzyme cofactor (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin in the gas phase, solution, and protein environments. *J. Phys. Chem. B.*, **110**(45): p. 22861-22871.
- [184] Crane B. R., Arvai A. S., Ghosh S., Getzoff E. D., Stuehr D. J. and Tainer J. A. (2000) Structures of the N-omega-hydroxy-L-arginine complex of inducible nitric oxide synthase oxygenase dimer with active and inactive pterins. *Biochemistry*, **39**(16): p. 4608-4621.
- [185] Singh M. K., Pal H., Bhasikuttan A. C. and Sapre A. V. (1999) Photophysical properties of the cationic form of neutral red. *Photochemistry and Photobiology*, **69**(5): p. 529-535.
- [186] Presta A., Siddhanta U., Wu C. Q., Sennequier N., Huang L. X., Abu-Soud H. M., Erzurum S. and Stuehr D. J. (1998) Comparative functioning of dihydro- and tetrahydropterins in supporting electron transfer, catalysis, and subunit dimerization in inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry*, **37**(1): p. 298-310.
- [187] Abu-Soud H. M., Wu C. Q., Ghosh D. K. and Stuehr D. J. (1998) Stopped-flow analysis of CO and NO binding to inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry*, **37**(11): p. 3777-3786.
- [188] Bartberger M. D., Liu W., Ford E., Miranda K. M., Switzer C., Fukuto J. M., Farmer P. J., Wink D. A. and Houk K. N. (2002) The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**(17): p. 10958-10963.
- [189] Ost T. W. B., Miles C. S., Munro A. W., Murdoch J., Reid G. A. and Chapman S. K. (2001) Phenylalanine 393 exerts thermodynamic control over the heme of flavocytochrome P450BM3. *Biochemistry*, **40**(45): p. 13421-13429.
- [190] Ost T. W. B., Clark J., Mowat C. G., Miles C. S., Walkinshaw M. D., Reid G. A., Chapman S. K. and Daff S. (2003) Oxygen activation and electron transfer in flavocytochrome P450BM3. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**(49): p. 15010-15020.
- [191] Chen Z. C., Ost T. W. B. and Schelvis J. P. M. (2004) Phe393 mutants of cytochrome P450BM3 with modified heme redox potentials have altered heme vinyl and propionate conformations. *Biochemistry*, **43**(7): p. 1798-1808.
- [192] Migita C. T., Salerno J. C., Masters B. S. S., Martasek P., McMillan K. and IkedaSaito M. (1997) Substrate binding-induced changes in the EPR spectra of the ferrous nitric oxide complexes of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry*, **36**(36): p. 10987-10992.
- [193] O'Keeffe D. H., Ebel R. E. and Peterson J. A. (1978) Studies of Oxygen Binding-Site of Cytochrome-P-450 - Nitric-Oxide as a Spin-Label Probe. *J. Biol. Chem.*, **253**(10): p. 3509-3516.
- [194] Tsubaki M., Hiwatashi A., Ichikawa Y. and Hori H. (1987) Electron-Paramagnetic Resonance Study of Ferrous Cytochrome-P-450scc-Nitric Oxide Complexes - Effects of Cholesterol and Its Analogs. *Biochemistry*, **26**(14): p. 4527-4534.
- [195] Voegtle H. L., Sono M., Adak S., Pond A. E., Tomita T., Perera R., Goodin D. B., Ikeda-Saito M., Stuehr D. J. and Dawson J. H. (2003) Spectroscopic characterization of five- and six-coordinate ferrous-NO heme complexes. Evidence for heme Fe-proximal cysteinate bond cleavage in the ferrous-NO adducts of the Trp-409Tyr/Phe

- proximal environment mutants of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry*, **42**(8): p. 2475-2484.
- [196] Gautier C., van Faassen E., Mikula I., Martasek P. and Slama-Schwok A. (2006) Endothelial nitric oxide synthase reduces nitrite anions to NO under anoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **341**(3): p. 816-821.
- [197] Yonetani T., Yamamoto H., Erman J. E., Reed G. H. and Leigh J. S. (1972) Electromagnetic Properties of Hemoproteins .5. Optical and Electron-Paramagnetic Resonance Characteristics of Nitric-Oxide Derivatives of Metalloporphyrin-Apohemoprotein Complexes. *J. Biol. Chem.*, **247**(8): p. 2447-&.
- [198] Chiang R., Makino R., Spomer W. E. and Hager L. P. (1975) Chloroperoxidase - P-450 Type Absorption in Absence of Sulfhydryl Groups. *Biochemistry*, **14**(19): p. 4166-4171.
- [199] Morse R. H. and Chan S. I. (1980) Electron-Paramagnetic Resonance Studies of Nitrosyl Ferrous Heme Complexes - Determination of an Equilibrium between 2 Conformations. *J. Biol. Chem.*, **255**(16): p. 7876-7882.
- [200] Huttermann J., Burgard C. and Kappl R. (1994) Proton Endor from Randomly Oriented No-Ligated Hemoglobin - Approaching the Structural Basis for the R-T Transition. *J. Chem. Soc. - Faraday Trans.*, **90**(20): p. 3077-3087.
- [201] Tyryshkin A. M., Dikanov S. A., Reijerse E. J., Burgard C. and Huttermann J. (1999) Characterization of bimodal coordination structure in nitrosyl heme complexes through hyperfine couplings with pyrrole and protein nitrogens. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**(14): p. 3396-3406.
- [202] Wajnberg E., Linhares M. P., Eljaick L. J. and Bemski G. (1992) Nitrosyl Hemoglobin - Epr Components at Low-Temperatures. *Eur. Biophys. J.*, **21**(1): p. 57-61.
- [203] Yoshimura T., Ozaki T., Shintani Y. and Watanabe H. (1979) Electron-Paramagnetic Resonance of Nitrosylprotoheme Dimethyl Ester Complexes with Imidazole Derivatives as Model Systems for Nitrosylhemoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, **193**(2): p. 301-313.
- [204] Flores M., Wajnberg E. and Bemski G. (1997) Temperature dependence of Q-band electron paramagnetic resonance spectra of nitrosyl heme proteins. *Biophys. J.*, **73**(6): p. 3225-3229.
- [205] Goldfarb D., Bernardo M., Thomann H., Kroneck P. M. H. and Ullrich V. (1996) Study of water binding to low-spin Fe(III) in cytochrome P450 by pulsed ENDOR and four-pulse ESEEM spectroscopies. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**(11): p. 2686-2693.
- [206] Fernández M. L., Marti M. A., Crespo A. and Estrin D. A. (2005) Proximal effects in the modulation of nitric oxide synthase reactivity: a QM-MM study. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **10**(6): p. 595-604.
- [207] Carey P. R. (1982) Biochemical applications of Raman and resonance Raman spectroscopies, New York: Academic Press.
- [208] Spiro T. G. (1988) *Iron Sulfur Proteins and Analog Complexes*, in Biological application of Raman Spectroscopy, Vol. III, **12**, p. 523-553.
- [209] Spiro T. G. and Czernuszewicz R. S. (1995) *Resonance Raman Spectroscopy of Metalloproteins*, Biochemical Spectroscopy, in Methods in Enzymology **246**, p. 416-460.
- [210] Palmer G. (2000) *Electron Paramagnetic Resonance of Metalloproteins*, Physical Methods in BioInorganic Chemistry, in Spectroscopy and Magnetism, L. Que Jr. ed. Sausalito (Ca) p. 121-185.
- [211] Galli C., MacArthur R., AbuSoud H. M., Clark P., Stuehr D. J. and Brudvig G. W. (1996) EPR spectroscopic characterization of neuronal NO synthase. *Biochemistry*, **35**(8): p. 2804-2810.

Articles

